

**COMPLEXOS REGULADORS AMB  
PARTICIPACIÓ DE PROTEÏNES DE LA FAMÍLIA  
NOD: ESTUDIS SOBRE LA INTERACCIÓ ENTRE  
CITOCROM C I APAF-1 A L'APOPTOSOMA**

Noemí Marina García

Barcelona, 2006





DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE BIOLOGIA

Programa de Doctorat de Biomedicina  
Bienni 2000/2002

**COMPLEXOS REGULADORS AMB PARTICIPACIÓ DE PROTEÏNES DE LA  
FAMÍLIA NOD: ESTUDIS SOBRE LA INTERACCIÓ ENTRE CITOCROM C I  
APAF-1 A L'APOPTOSOMA**

Memòria presentada per Noemí Marina García per optar al títol de  
Doctor per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat en el Departament de Química Orgànica Biològica  
de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (C.S.I.C.)

Director

Tutor

**Jordi Bujons Vilàs**  
Científic titular  
Dpt. Química Orgànica Biològica  
Institut d'Investigacions Químiques  
i Ambientals de Barcelona  
(I.I.Q.A.B.-C.S.I.C.)

**Joan Carles Ferrer Artigas**  
Professor titular  
Dpt. Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona



*Alone, alone, all, all alone,  
Alone on a wide wide sea !*

S. T. Coleridge



## Agraïments

Aquesta tesi s'ha realitzat al Departament de Química Orgànica Biològica de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona del C.S.I.C., finançada per un projecte associat al Ministeri de Sanitat i Consum - Institut de Salut Carles III, durant els anys 2001-2006. Al llarg d'aquest temps, són molts els que han participat en la seva realització. A tots els que d'una manera o altra han contribuït, moltes gràcies!

Esperant no oblidar-me de ningú, vull fer arribar unes paraules especials d'agraïment a les persones que de forma més propera han fet possible aconseguir aquesta fita.

En primer lloc vull agrair al meu director de tesi, el Dr. Jordi Bujons, el haver-me donat l'oportunitat inicial de realitzar un Màster experimental i posteriorment continuar la Tesi doctoral, sota la seva supervisió. Gràcies pels seus consells, ajut i suport a l'hora de desenvolupar el treball experimental així com en la redacció d'aquesta memòria. Igualment vull donar les gràcies al Dr. Àngel Messeguer, per haver confiat en mi en oferir-me la possibilitat d'incorporar-me al seu grup, i permetre'm descobrir i gaudir de la "feina científica". Pel seu interès, consells i ànims constants al llarg de tots aquests anys.

El meu agraïment al Dr. Joan Carles Ferrer, professor titular del departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, per haver acceptat ser el tutor d'aquest treball. Al Dr. Enrique Pérez Payá, del Centre d'Investigació Príncepe Felipe, per la seva col.laboració en aquest projecte i per acollir-me al seu laboratori, i gràcies també a la Gema, la Mar i la Laura, per dur a terme l'expressió de l'Apaf-1-XL i els assaigs relacionats amb la identificació de moduladors de l'apoptosoma, així com per ajudar-me durant les meves estades a València. Al Dr. Àngel G. Martín, per facilitar-me dues de les construccions d'Apaf-1-XL. A la Dra. Pilar Marco, el Dr. Francisco Sánchez, la Dra. Gemma Fabriàs i la Dra. M. Dolors Piulachs, per obrir-me les portes dels seus laboratoris i per mostrar-me el seu interès, i a tots els membres del CID que han facilitat poder realitzar aquesta feina. La Dra. Francesca Reig, per permetre'm utilitzar el seu espectrofluorímetre, la Roser i la Dori, pel seu ajut en l'anàlisi de mostres per espectrometria de masses i l'Alicia pel seu ajut amb el *cell disrupter* i la cromatografia. A les "secres", Àngels i Josefina, per la seva amabilitat i estar sempre disposades a donar un cop de mà.

*I would like to thank Prof. Gabriel Núñez for giving me the amazing opportunity of joining his research group at the Pathology department of the University of Michigan (Ann Arbor), for trusting in me to develop such a exciting scientific work, for his advice, encouragement and comprehension. Vull agrair a la Generalitat de Catalunya la concessió d'una beca de recerca per a estades fora de Catalunya.*

Especialment vull fer arribar el meu agraïment a tots aquells que al llarg d'aquests anys han estat companys de viatge al 309. Per mirar d'entendre la meva feina i respectar la zona «bio», pel vostre ajut i comprensió, i per tots els moments de diversió que hem compartit dins i fora del laboratori. Gràcies a la Maia, la Susana, el Marc, l'Anna, el Jordi G., els primers que van baixar-se d'aquest tren, la Isabel, la Núria, el Rafa, el Quim i el Jordi E., companys durant bona part del camí, i a tots els que han anat pujant, el Raul, l'Annita, la Sandra, la Cristina, la Glòria, l'Aïda... Igualment, gràcies a tots els “eliseros”, el Roger, la Carme, l'Hèctor, la Mika, la Núria S., el Pablo, el Xavi, el Javi, el Dani, la Begoña, l'Eva...per fer-me companyia durant tantes hores “d'okupa” al 305, i per les estones que hem compartit fora. A la Montse Serra, per compartir dubtes.

*Thank you also to all the “Nunes lab family”. I specially would like to thank Christine for guiding me in a new kind of work, for answering all my questions and for being always willing to help, and Luigi for being such a patient and helpful bench-mate. Christine, Katy, Peter, Raul and Gloria, thank you for sharing lunch, ice creams and parties!*

*Gracias a toda la otra “familia” de Ann Arbor sin la cual la vida tan lejos sería tan distinta. En especial a mis “roommates” Sonsoles, Roberto y Luis, por recibirme con las puertas abiertas y descubrirme Ann Arbor. A Maite, Ale, Coni y Gabri, por acordaros siempre de mi para tomar un “piscosauer”. A toda la “spanish people”, por invitarme a compartir tantos inolvidables momentos y hacer de Ann Arbor un sitio tan divertido. Gracias por poner a los Chichos, Javi! Roberto, gracias por recibirme de nuevo.*

*Sonso, gracias por las interminables charlas en el Ambrosia y por continuar contagiándome tu optimismo.*

*Alicia, Laura, Alicia, Mónica, Belén, Lara, Elisabet, gracias por acordaros siempre de mi y por seguir creciendo juntas!*

*Olga, gracias por encontrar siempre un momento, por tratar de entenderme, por tus ánimos y por tu ejemplo. Jordi, gracias por tus consejos y por continuar siendo*



*tan auténtico. Gracias a los dos por vuestra larga amistad, y por recordarme que nunca hay que dejar de creer y de luchar!*

*Javi, sin tu cariño hubiese sido tan difícil afrontar la recta final de esta tesis...gracias por tu paciencia, por escucharme, por tranquilizarme mostrándome la solución para cualquiera de mis problemas y por contagiarme tu alegría.*

*Ana, muchas gracias por convertirte en mi “secretaria particular” y haberte encargado de toda la burocracia alrededor de la tesis. Gracias por todas esas canciones. Sin tu ayuda y tus ánimos no hubiese podido llegar hasta aquí.*

*Gracias a toda mi familia por interesaros siempre por mi, por vuestro cariño y por tantas risas compartidas.*

*Gracias sobretodo a mis padres y a mi hermana, por vuestro amor incondicional, vuestros consejos, vuestro respeto y apoyo en mis decisiones. Ana, gracias por ser tan valiente! A vosotros dedico el esfuerzo y la ilusión de este trabajo.*



## ÍNDEX



Abreviatures	1
<b>I. INTRODUCCIÓ GENERAL</b>	<b>5</b>
1. Apoptosi.	7
2. Activació i regulació de l'apoptosi.	9
2.1. Caspases.	10
2.2. Mitocòndria i apoptosi	12
2.3. L'apoptosoma.	14
2.3.1. Apaf-1: el component principal de l'apoptosoma.	15
2.3.2. Citocrom c: l'inductor de la formació de l'apoptosoma.	18
2.3.3. Interacció entre Apaf-1 i citocrom c.	20
2.3.4. Interacció amb caspasa-9: Estructura de l'apoptosoma.	22
3. NOD ( <i>Nucleotide oligomerization domain</i> ): motiu involucrat a la regulació de l'apoptosi i a la defensa de l'hoste front a patògens.	27
3.1. Mecanismes de resistència a patògens.	27
3.2. Família de proteïnes NOD.	29
3.3. Estructura de les proteïnes NOD.	30
3.4. Regulació de les proteïnes NOD.	32
3.5. Proteïnes NOD associades a malalties.	34
<b>II. OBJECTIUS.</b>	<b>37</b>
<b>III. MATERIALS i MÈTODES.</b>	<b>41</b>
1. PROCEDIMENTS GENERALS.	43
1.1. Equipament i instrumentació.	43
1.2. Reactius.	44
1.3. Procediments d'esterilització.	44
1.4. Cultius bacterians.	45
1.4.1. Soques d' <i>E. coli</i> .	45
1.4.2. Medis de cultiu.	45
1.5. Mètodes de biologia molecular.	46
1.5.1. Plasmidis i vectors.	46
1.5.2. Preparació i transformació de cèl.lules d' <i>E. coli</i> competents.	47
1.5.3. Preparació d'ADN plasmídic.	48
1.5.4. Reaccions de modificació de l'ADN.	49
1.5.5. Electroforesi d'ADN.	50
1.5.6. Seqüenciació d'ADN.	51
1.6. Anàlisi de proteïnes.	51
1.6.1. Electroforesi en gels d'acrilamida SDS-PAGE.	51
1.6.2. Tinció amb plata.	51
1.6.3. Western-blot.	52
1.6.4. Quantificació.	52
2. PRODUCCIÓ DE MUTANTS DE YCIT C.	52
2.1. Mutagènesi dirigida.	52
2.2. Expressió dels mutants.	53
2.3. Purificació dels citocroms c recombinants.	54

3. PRODUCCIÓ DE CONSTRUCCIONS DERIVADES D'APAF-1-XL.	55
3.1. Mutagènesi dirigida	55
3.2. Expressió de les construccions derivades d'Apaf-1-XL.	57
3.3. Purificació de la construcció Apaf-1-XL(582-1248).	57
3.4. Construccions clonades a pGEX6P1 i pGEX4T1: Apaf-1-XL(1-570), Apaf-1-XL(1-572) i Apaf-1-XL(570-1248).	58
4. OBTENCIÓ DE DERIVATS DE CITOCROM C.	59
4.1. Obtenció de hemopèptids derivats de citocrom c per reacció amb BrCN.	59
4.2. Preparació de Zn-citocrom.	59
5. CARACTERITZACIÓ BIOFÍSICA DELS MUTANTS I CONSTRUCCIONS DERIVADES DE CITOCROM I APAF-1.	60
5.1. Espectrometria de masses.	60
5.2. Dicroisme circular.	61
5.3. Espectroscòpia d'absorció electrònica.	61
5.4. Espectrometria de fluorescència.	62
5.5. Ressonància magnètica nuclear.	62
6. CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ ENTRE APAF-1 I ELS MUTANTS I DERIVATS DE CITOCROM C.	62
6.1. Assaigs d'activació de procaspases.	62
6.1.1. Reconstitució d'apoptosomes <i>in vitro</i> i activació de PC-9.	63
6.1.2. Assaigs de detecció dels processament de caspasa-3 <i>in vitro</i> emprant extractes lliures de cèl.lules.	63
6.2. Assaigs de polarització de fluorescència.	64
6.2.1. Assaigs d'interacció entre Apaf-1-XL i ZnHHCc.	64
6.2.2. Assaigs de competència.	64
7. ESTUDIS SOBRE EL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE NOD2 EN RESPOSTA AL MURAMIL DIPÈPTID (MDP).	65
7.1 Mètodes generals.	65
7.1.1 Soques cel.lulars.	65
7.1.2 Cultius d'HEK293 i HEK293T.	65
7.1.3. Obtenció dels lisats cel.lulars.	65
7.1.4. Cultius de cèl.lules de macròfag.	65
7.1.5. Plasmidis i vectors.	66
7.2. Assaigs de precipitació de HA-Nod2 amb MTP-biotina.	66
7.2.1. Procediment general.	66
7.2.2. Assaig de preconcentració per immunoprecipitació de HA-Nod2.	67
7.3. Assaigs d'entrecreuament.	68
7.3.1. Obtenció del Muramil dipèptid (MDP) o Muramil tripèptid (MTP) units al reactiu d'entrecreuament (XL), MDP-XL i MTP-XL.	68
7.3.2. Assaigs d'entrecreuament emprant lisats cel.lulars	68
7.3.3. Assaigs d'entrecreuament emprant cultius cel.lulars.	69
7.3.4. Assaig d'activació de NFκB: assaig de la luciferasa.	69
7.4. Columnes d'afinitat de MDP i MTP.	70
7.4.1. Preparació de les columnes d'afinitat.	70
7.4.2. Purificació per afinitat.	71
7.5. Clonatge i assaigs d'expressió i purificació del domini LRR de Nod2 i Nod2L1007fs.	71
7.5.1. Clonatge del domini LRR de Nod2 i Nod2L1007fs.	71

7.5.2. Cribratge per PCR i digestió amb enzims de restricció.	73
7.5.3. Assaigs preliminars d'expressió i purificació.	74
7.6. Assaigs preliminars per a la determinació de la localització subcel.lular del MDP.	74
7.6.1. Assaigs de localització per immunofluorescència emprant MDP-XL o MTP-XL.	74
7.6.2. Assaigs de localització emprant el derivat fluorescent MDP-FITC.	74
7.6.3. Fixació de cèl.lules per a la detecció per immunofluorescència.	75
<b>IV. RESULTATS i DISCUSSIÓ.</b>	<b>77</b>
<b>1. PREPARACIÓ DE VARIANTS DE CITOCROM C DE LLEVAT DISSENYADES PER DOTAR-LES DE CAPACITAT PER INTERACCIONAR AMB APAF-1.</b>	<b>79</b>
1.1. Introducció.	79
1.2. Obtenció de mutants de citocrom c de llevat.	81
1.3. Obtenció de fragments peptídics derivats de citocrom c.	85
1.4. Degradació dels mutants de YCit c amb BrCN en medi de TFA.	91
1.5. Caracterització dels hemopèptids per dicroisme circular.	92
<b>2. OBTENCIÓ DE CONSTRUCCIONS DERIVADES D'APAF-1-XL: APAF-CARD-NOD/CED4 I APAF-WDR.</b>	<b>95</b>
2.1. Introducció.	95
2.2. Clonació dels dominis CARD-NOD/CED4 i WDR en vectors d'expressió bacteriana.	97
2.3. Obtenció de les variants truncades derivades d'Apaf-1-XL.	101
2.3.1. Purificació de proteïnes expressades com a cossos d'inclusió.	101
2.3.2. Obtenció d'Apaf-1-XL(582-1248).	103
2.3.3. Obtenció d'Apaf-1-XL(1-570).	108
2.3.4. Expressió i purificació de les construccions Apaf-1-XL(1-572) i Apaf-1-XL(570-1248).	109
2.4. Discussió.	111
<b>3. ASSAIGS IN VITRO D'ACTIVACIÓ DE CASPASES I INTERACCIÓ AMB APAF-1.</b>	<b>115</b>
3.1 Introducció.	115
3.2 Assaigs d'activació de procaspasa-9.	117
3.3 Assaigs de polarització de fluorescència.	122
3.4. Caracterització funcional de les construccions CARD-NOD/CED4 i WDR derivades d'Apaf-1-XL.	126
<b>4. CARACTERITZACIÓ DEL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE NOD2 EN RESPOSTA A MURAMILDIPÈPTID (MDP). IDENTIFICACIÓ BIOQUÍMICA DEL COMPLEX DE RECONeixEMENT DE MDP.</b>	<b>129</b>
4.1. Introducció	129
4.1.1 Reconeixement del muramildipèptid (MDP) per Nod2.	130
4.2. Assaigs d'unió <i>in vitro</i> .	132
4.2.1. Assaigs d'immunoprecipitació de HA-Nod2 emprant MTP-biotina.	132
4.2.2. Assaig d'entrecreuament.	133
4.3. Cribratge bioquímic mitjançant cromatografia d'afinitat.	136

4.3.1. Assaigs de purificació per cromatografia d'afinitat emprant columnes MDP-agarosa i MTP-agarosa.	136
4.3.2. Purificació per cromatografia d'afinitat emprant columnes d'afinitat FLAG-LRR. Clonatge, expressió i purificació de FLAG- Nod2LRR i FLAG-Nod2L1007fs LRR.	138
4.4. Localització cel.lular del MDP.	139
<b>V. CONCLUSIONS.</b>	143
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.</b>	147
<b>VII. APÈNDIX.</b>	163







aa	aminoàcid
Ab	anticòs
Abs.	absorció electrònica
ACN	acetonitril
AcOH	àcid acètic
Ac-DEVD-afc	acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADP	adenosin difosfat
Amp	ampicil.lina
Apaf-1	factor activador de proteases apoptòtiques
ARN	àcid ribonucleic
<i>ase</i>	antisentit
ATP	adenosin trifosfat
bp	parell de bases
BSA	seroalbúmina bovina
conc.	concentració
cADN	ADN codificant
CARD	domini de reclutament de caspases
CHAPS	àcid 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonil]propansulfònic
Cit c	citocrom c
dADN	ADN de doble cadena
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindole
dATP	deoxiadenosin trifosfat
DC	dicroisme circular
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMEM+	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i> suplementat
DMSO	dimetil sulfòxid
DPBS	<i>Dulbecco's PBS</i>
DTE	ditioeritrol
DTT	ditiotreitrol
$\delta$	desplaçament químic
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	àcid etilenbis(oxonitril)tetraacètic
EtOH	etanol
ESI-MS	espectrometria de masses per ionització electrosprai
$\epsilon$	coeficient d'extinció molar
FBS	sèrum boví fetal
FIA	anàlisi per injecció en flux
FITC	isotiocianat de fluoresceïna
fmk	fluorometil cetona
FMOC	9-fluorometil cloroformiat
FPLC	cromatografia líquida ràpida de proteïnes
GST	glutatió S- transferasa
h	hora
$^1\text{H-RMN}$	ressonància magnètica nuclear de protó
HCit c	citocrom c humà
HEPES	àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperazinetanosulfònic
HHCit c	citocrom c de cor de cavall
hp	hemopèptid
HPLC	cromatografia líquida d'alta eficàcia
Hse	homoserina
Hsl	homoserina lactona

IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactòsid
$K_a$	constant d'afinitat
Kbp	kiloparell de bases
$K_d$	constant de dissociació
KDa	kiloDaltons
LPS	lipopolisacàrid
LRD	domini de reconeixement de lligands
LRR	repeticions riques en leucines
$\lambda_{exc}$	longitud d'ona d'excitació
$\lambda_{em}$	longitud d'ona d'emissió
MALDI-TOF	espectrometria de masses amb ionització per desorció de làser assistida per matriu - temps de vol
MBMM	macròfags derivats de la medul·la òssia de ratolí
MDa	megaDaltons
MDP	muramil dipèptid
Meso-DAP	àcid meso-diaminopimèlic
MetOH	metanol
min	minuts
MME	membrana mitocondrial externa
ms	milisegons
MS	espectrometria de masses
MTP	muramil tripèptid
m/z	relació massa/càrrega
NOD	domini d'oligomerització i unió de nucleòtids
NP-40	nonident P40
OD	densitat òptica
O/N	tota la nit
P	polarització de la fluorescència
$P_o$	polarització de la fluorescència inicial
(p/v)	pes/volum
PBS	tampó fosfat salí
PC-3	procaspasa-3
PC-9	procaspasa-9
PCD	mort cel·lular programada
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
p.e.	per exemple
PETCM	$\alpha$ -(triclorometil)-4-piridinetanol
PGN	peptidoglicà
PIC	barreja d'inhibidors de proteases
PIPES	àcid 1,4-piperacindietanosulfònic
PKA	protein-kinasa A
PMA	12-miristol-13-acetil diester de forbol
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
ppm	parts per milió
Rdt.	rendiment
RE	reticle endoplasmàtic
ROS	espècies reactives d'oxigen
$R_z$	factor de puresa del citocrom c
s	segons
SDS	dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
se	sentit

---

Sulfo-SBED	sulfosuccinimidil 2-[6-(biotinamido)2-( <i>p</i> -azidobenzamido)hexanoamido]etil-3-ditiopropionat
t	temps
t <sub>R</sub>	temps de retenció
T <sub>amb</sub>	temperatura ambient
TFA	àcid trifluoracètic
TFE	trifluoroetanol
T <sub>m</sub>	temperatura de fusió o desnaturalització
TNB	5,5'-ditiobis[2-nitrobenzoat]
Tris	tris(hidroximetil)aminoetà
TRX	tioredoxina
UFA	unitats de fluorèscencia
Ufp	unitats formadores de plaques
UV	llum ultraviolada
(v/v)	volum/volum
VDAC	canal aniònic dependent de voltatge
WDR	domini de repeticions WD-40
YCit c	citocrom c de llevat
[ $\theta$ ]	el.lipticitat molar



# I. INTRODUCCIÓ GENERAL





La mort cel·lular programada o apoptosi és un mecanisme pel qual les cèl·lules dels organismes pluricel·lulars són capaces de dur a terme una sèrie de processos bioquímics encaminats a produir la seva mort de forma controlada. Aquest mecanisme generalment pot iniciar-se com a part del desenvolupament normal de les estructures de l'organisme, o bé per tal d'eliminar cèl·lules que puguin suposar una amenaça.

El terme apoptosi va ser emprat per primera vegada per Kerr i col. al 1972 per descriure el fet morfològic de la formació de "cossos apoptòtics" a la cèl·lula (Kerr, 1972). No obstant, l'impacte d'aquest procés en l'homeòstasi cel·lular no va ser reconegut fins el descobriment de que la mort cel·lular està controlada genèticament als organismes pluricel·lulars (Strasser, 2000), al fet que els seus mecanismes estan conservats des dels cucs fins als mamífers, (Hengartner, 2000), així com a la seva implicació en un gran nombre de malalties. Aquest paper central a la vida dels organismes multicel·lulars (Hengartner, 2000; Raff, 1998), ha estat la causa de que als darrers anys el nombre de publicacions relacionades amb l'apoptosi s'hagi incrementat exponencialment, arribant a representar un 2% (dada corresponent a l'any 2003, *ISI-Web of science*) de les publicacions relacionades amb les ciències de la vida (Lawen, 2003), el que ha portat a un creixent coneixement de les seves bases moleculars.

## **1. Apoptosi.**

L'apoptosi és un dels processos cel·lulars centrals al desenvolupament, l'homeòstasi cel·lular, la resposta a l'estrès, l'envelliment i les malalties, als organismes eucariotes pluricel·lulars (Delhalle, 2003; Hengartner, 2000).

L'apoptosi s'associa a una sèrie de canvis cel·lulars, morfològics i bioquímics, que inclouen la condensació de la cromatina, la contracció del citoplasma i la formació de vesícules de membrana plasmàtica (Strasser, 2000). La cèl·lula es trenca donant lloc a múltiples esferes de membrana de mida diversa, que contenen el material cel·lular, anomenades cossos apoptòtics (Lawen, 2003). Sota condicions fisiològiques, es donen certes modificacions a la membrana plasmàtica, com la distribució aleatòria de la fosfatidilserina a ambdues cares de la membrana, que permeten el reconeixement dels cossos apoptòtics per part de les cèl·lules fagocítiques. Donat que els cossos apoptòtics estan envoltats de membrana plasmàtica intacta, l'apoptosi normalment té lloc sense abocament del contingut cel·lular ni inflamació. Aquesta forma de mort cel·lular és morfològicament diferent de la necrosi, en la que la cèl·lula s'infla i es desintegra de forma desordenada, eventualment conduint a la destrucció dels orgànuls cel·lulars i a

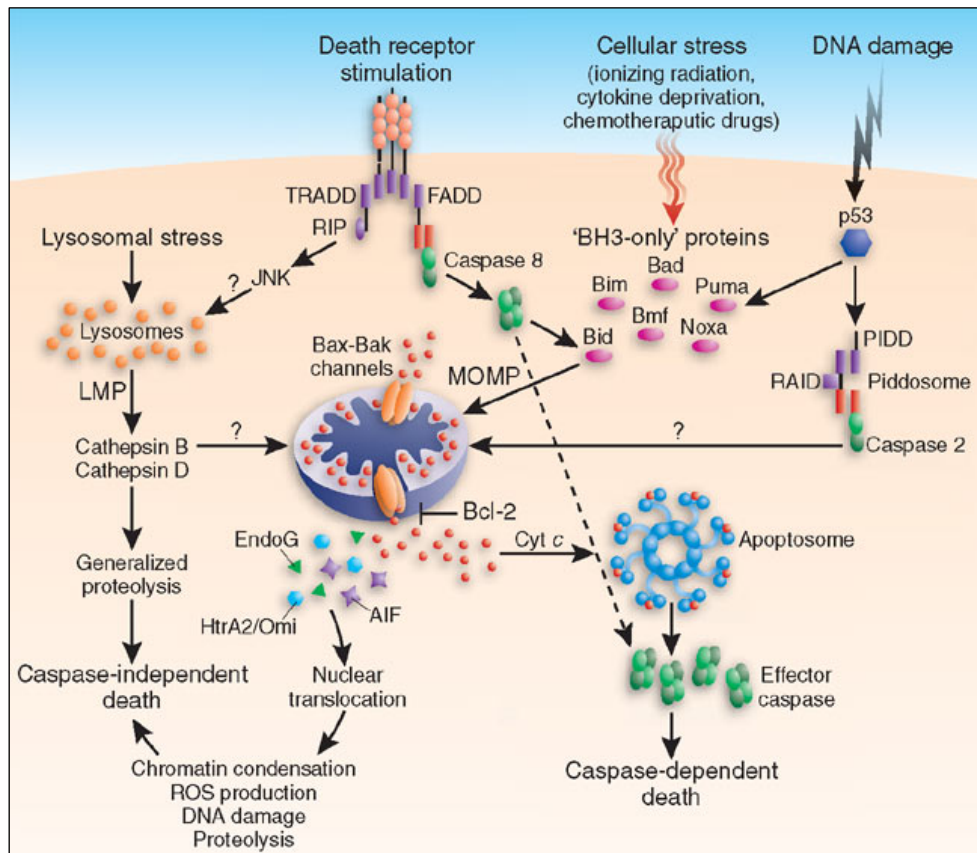
la ruptura de la membrana plasmàtica i abocament del contingut cel·lular. Generalment es veuen afectades vàries cèl·lules contigües, el que produeix una inflamació del teixit que les envolta. Aquesta té lloc en resposta a un estímul tòxic, com hipòxia, isquèmia, verins metabòlics o un trauma cel·lular directe, i és una mort accidental o patològica, però els mecanismes moleculars són encara força desconeguts. En algunes patologies totes dues formes de mort cel·lular es poden donar, per exemple un dany isquèmic es caracteritza per un centre de cèl·lules necròtiques envoltat per cèl·lules apoptòtiques (Fadeel, 1999; Danial, 2004).

L'observació d'una morfologia apoptòtica comuna a diferents espècies, va assenyalar cap a l'existència d'una base comuna per a la mort cel·lular. Aquesta suposició es va confirmar amb la identificació de vies cel·lulars conservades i amb l'existència d'una homologia funcional entre la maquinària apoptòtica de diferents espècies, tot i que als animals amb major complexitat augmenta el nombre de proteïnes involucrades al control del procés apoptòtic (Koonin, 2000; Aravind, 2001).

La primera evidència d'una base genètica per a la regulació de l'apoptosi va provenir d'estudis al nematode *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974; Ellis, 1986; Sulston, 1976). Durant el desenvolupament d'un adult *C. elegans*, 131 cèl·lules específiques de les 1090 cèl·lules totals, moren per apoptosi. Diferents estudis genètics van permetre identificar els gens específics involucrats a la regulació, execució i resolució de l'apoptosi. D'aquests, *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* i *ced-9*, estan implicats a l'execució de la mort cel·lular i afecten la totalitat de les 131 cèl·lules que pateixen apoptosi. *Ced-3* codifica per una cisteïn-proteasa que pertany a una família de proteases evolutivament conservades, anomenades caspases (*cysteine-aspartate proteases*). Com la majoria de les proteases, les caspases són sintetitzades com a zimògens, que són activats per proteòlisi. La proteïna Ced-4 participa en l'activació de Ced-3. Excepte si Egl-1 és expressada, Ced-4 està localitzada a la mitocòndria mitjançant una interacció amb Ced-9. Quan s'expressa la Egl-1, s'interromp la interacció entre Ced-4 i Ced-9, i Ced-4 es transloca a la membrana nuclear, on activa Ced-3, senyal que inicia l'apoptosi (Twomey, 2005).

Aquesta maquinària de mort cel·lular està conservada a altres metazous. A mamífers, ICE (*interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*), identificada inicialment com una proteasa amb un paper important a la resposta inflamatòria, va ser posteriorment relacionada amb Ced-3 (Yuan, 1993). Igualment, es va provar que *ced-9* era l'homòleg de l'oncogen de mamífers Bcl-2 (Hengartner, 1994; Vaux, 1992). D'altra banda, l'únic homòleg de Ced-4 caracteritzat fins el moment a humans és Apaf-1 (*Apoptotic*

*protease activating factor-1*) (Zou, 1997), que requereix del citocrom c (Cit c) mitocondrial per a la seva activació (Li, 1997) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de les vies apoptòtiques intrínseca i extrínseca a mamífers (Kroemer, 2005).

## 2. Activació i regulació de l'apoptosi.

Les vies d'activació i regulació de l'apoptosi són extremadament complexes i impliquen la participació d'un gran nombre de proteïnes i factors. A les cèl·lules de mamífer han estat identificades dues vies principals d'activació: la via extrínseca, que comprèn l'estimulació dels receptors de mort cel·lular, i la via intrínseca, en la que diferents estímuls proapoptòtics produeixen la permeabilització de la membrana mitocondrial externa, el que permet l'alliberament al citosol de factors proapoptòtics, com Cit c. La interacció de Cit c amb Apaf-1 indueix la formació d'un complex multimèric anomenat apoptosoma, el qual promou l'activació de la procaspasa-9 (PC-9) que alhora activa la procaspasa-3 (PC-3), iniciant la cascada d'activació de caspases (Kroemer, 2005) (Figura 1). És en aquesta via intrínseca on es centrarà la major part d'aquesta Introducció General.

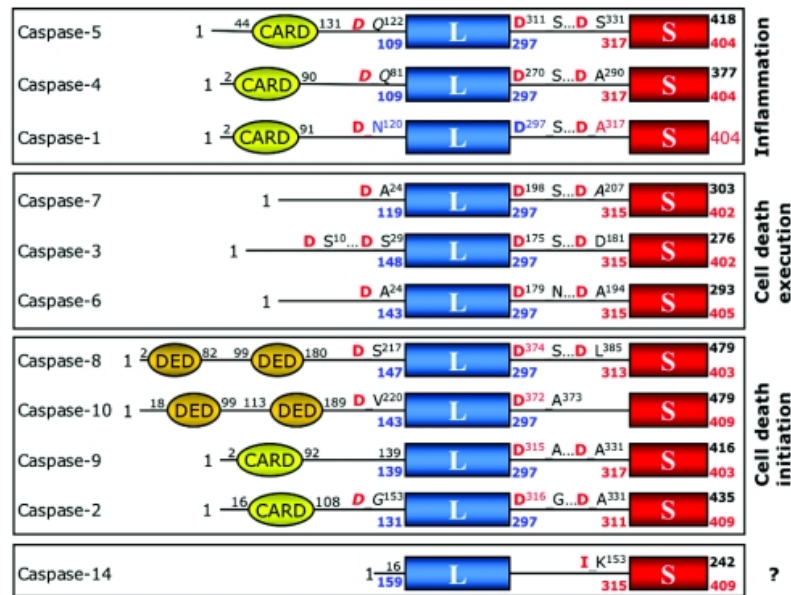
## 2.1. Caspases.

Les caspases són components centrals del procés d'apoptosi. Constitueixen una família de cisteïn-proteases que comparteixen especificitat per tallar els seus substrats a continuació d'un residu d'aspàrtic. Es troben estrictament a metazous, sent el primer membre identificat en humans l'enzim ICE, actualment anomenat caspasa-1. Diversos estudis han portat a la identificació de catorze caspases a mamífers (Shy, 2002) (Taula 1).

**Taula 1.** Propietats dels membres de la família de les caspases, (m, murines).

Nom de la caspasa	Altres noms	Preferència de tetrapèptid	Funció	Mida del prodomini	Tipus de prodomini	Proteïna adaptadora
Caspases importants per l'execució i senyalització de l'apoptosi						
caspasa-2	ICH-1/mNedd2	DEHD/VDVAC	Iniciadora	Llarg	CARD	RAIDD
caspasa-8	MACH/FLICE/Mch5	LETD/IETD	Iniciadora	Llarg	DED	FADD
caspasa-9	ICE-LAP6/Mch6	LEHD	Iniciadora	Llarg	CARD	Apaf-1
caspasa-10	Mch4, FLICE2	IEAD	Iniciadora	Llarg	DED	FADD
caspasa-3	CPP32/Apopaïna/Yama	DMQD/DEVD	Efectora	Curt		Cap
caspasa-6	Mch2	VEID/VEHD	Efectora	Curt		Cap
caspasa-7	Mch3/ICE-LAP3/CMH-1	DEVD	Efectora	Curt		Cap
Caspases que participen al control de la inflamació						
caspasa-1	ICE	WEHD/YEVD		Llarg	CARD	
caspasa-4	TX/ICH-2/ICE <sub>REL-II</sub>	LEVVD/(W/L)EHD		Llarg	CARD	
caspasa-5	TY/ICE <sub>REL-III</sub>	(W/L)EHD		Llarg		
m-caspasa-11	ICH-3			Llarg		
m-caspasa-13				Llarg		
m-caspasa-12	ERICE			Llarg		
caspasa-14	MICE			Curt		

El genoma humà codifica per dotze caspases (Kroemer, 2005) (Figura 2). Algunes d'elles participen a l'activació de les citokines i la inflamació i almenys set contribueixen al procés de mort cel·lular (caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10). Aquestes darreres es poden subclassificar en dos grups, les caspases iniciadores i les efectores, segons el moment en que participen a la via apoptòtica. Les caspases iniciadores (caspases -2, -8, -9 i -10) són les primeres en ser activades en resposta a un estímul apoptòtic. La característica principal de les caspases iniciadores és la seva especificitat de substrat, que, un cop activades, les permet reconèixer i activar les caspases efectores (caspases -3, -6 i -7).



**Figura 2.** Organització dels dominis de les caspases humanes. L, subunitat gran (p20), S, subunitat petita (p10) (Fuentes-Prior, 2004).

Les caspases són sintetitzades com a proenzims (30-50 KDa) que consten de tres dominis: un prodomini *N*-terminal, una subunitat gran p20, de 17-20 KDa, i una subunitat petita p10, de 10-12 KDa (Figura 2). L'enzim madur està constituït per dos dominis catalítics provinents de dues cadenes peptídiques. Cadascun d'aquests dominis està format per una subunitat p20 i una subunitat p10 fortament empaquetades (Fuentes-Prior, 2004). Els residus His<sup>237</sup> i Cys<sup>285</sup> (numeració corresponent a la caspasa-1) constitueixen la diada catalítica. Les seqüències consens reconegudes consten de quatre residus, essent sempre un residu d'Asp a l'extrem *C*-terminal (Taula 1).

Mentre que les caspases efectores contenen prodominis petits, les caspases iniciadores i inflammatòries presenten prodominis grans, de més de 90 aminoàcids, que contenen una o dues còpies dels dominis globulars de reclutament CARD (*caspase-recruitment domain*) o DED (*death effector domain*). Aquest dominis són crítics per a la seva oligomerització i activació *in vivo*. Una activitat no regulada de les caspases seria letal per a la cèl·lula, i per aquesta raó s'emmagatzemen com a precursors latents (procaspases), amb una activitat intrínseca molt baixa, que requereixen d'una etapa d'activació proteolítica o per interacció amb un activador al·lostèric.

L'activació de les caspases iniciadores i de les inflammatòries requereix de la dimerització dels monòmers inactius, la qual té lloc *in vivo* seguint un model de proximitat induïda, mitjançant la formació d'una sèrie de complexos macromol·culars com l'inflamosoma, el PIDDosoma, el DISC (*death inducing signaling complex*) o

l'apoptosoma (Kroemer, 2005). Si bé en un principi es va creure que totes les caspases eren activades per digestió limitada que permetria la reorganització estructural de les subunitats p10 i p20 per generar el centre catalític (Cain, 2002; Fuentes-Prior, 2004), estudis més recents han posat de manifest que la proteòlisi no és requerida ni suficient per a l'activació de les caspases iniciadores -8 i -9. La regió d'unió entre les subunitats d'aquestes procaspases és suficientment llarga i flexible per permetre un canvi conformacional que conduirà a la formació del centre actiu (Cain, 2002). En contrast amb les anteriors, les caspases efectores -3, -6 i -7 es troben al citosol com a dímers inactius, i són activades per proteòlisi específica a la regió d'unió entre les dues subunitats p10 i p20, per acció de les caspases iniciadores.

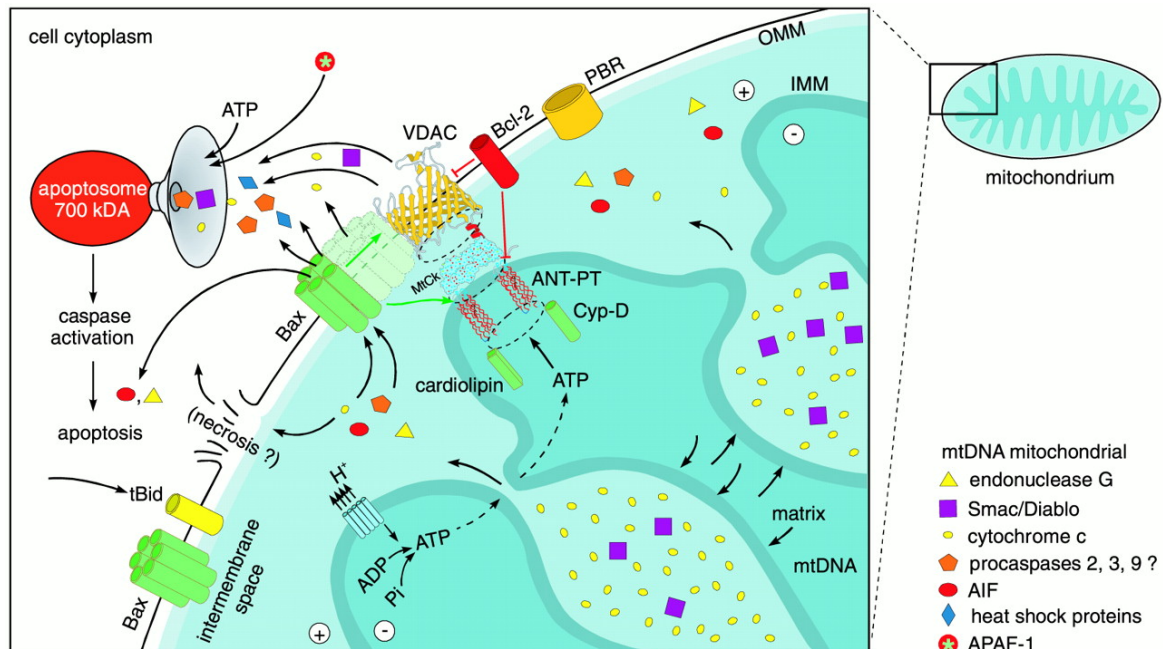
Un cop activades, les caspases efectores són capaces de processar múltiples substrats cel·lulars, el que dona lloc als canvis cel·lulars que ocorren durant l'apoptosi. Així, les caspases aturen el cicle cel·lular, inactiven proteïnes involucrades en la replicació i reparació de l'ADN, inactiven inhibidors de l'apoptosi com XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) o ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNAase*), i desestructuren el citoesquelet, el que tot plegat condueix a la mort cel·lular.

## **2.2. Mitocòndria i apoptosi**

La mitocòndria juga un paper central a l'activació de la via apoptòtica intrínseca on intervé per tres mecanismes diferents (Miller, 1998). D'una banda amb la disrupció dels processos de transport electrònic, fosforilació oxidativa i producció d'ATP. S'ha comprovat que la ceramida, implicada a la senyalització de l'apoptosi, interromp el transport electrònic. Igualment, Fas interromp la funció del Cit c a la cadena de transport electrònic. En segon lloc participa amb la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i l'alteració del potencial redox cel·lular. Durant l'apoptosi s'ha vist com es veuen incrementats els nivells de superòxids i de lipoperoxidació, tot i que aquest fenomen seria tardà i tindria lloc amb posterioritat a l'activació de les caspases. Finalment el tercer mecanisme pel que la mitocòndria intervé a l'apoptosi, és l'alliberament al citosol de diversos factors activadors de les caspases localitzats a l'espai intermembrana mitocondrial, com el Cit c, l'AIF (*apoptosis inducing factor*) o Smac/Diablo.

Per permetre l'alliberament al citosol d'aquestes proteïnes, s'ha de donar una permeabilització de la membrana mitocondrial externa (MME). Aquesta permeabilització està modulada per proteïnes de la família Bcl-2. Els membres antiapoptòtics, com Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>, inhibeixen la sortida de les proteïnes mitocondrials,

mentre que els membres proapoptòtics, com Bax, Bak o els membres de la subfamília BH3-*only*, l'estimulen. Ara bé, els mecanismes precisos pels que es produeix la sortida de les proteïnes mitocondrials i com són regulats per les proteïnes Bcl-2 és encara incert (Orrenius, 2004).



**Figura 3.** Regulació mitocondrial de l'apoptosi (Mayer, 2003).

Prevalen dues teories per explicar la permeabilització que permetrà la sortida del Cit c: la basada en una ruptura inespecífica de la MME i la que postula la formació de canals (Desagher, 2000). La ruptura inespecífica de la MME estaria causada per l'entrada d'aigua i soluts a la matriu mitocondrial durant l'apoptosi. La major superfície de la membrana mitocondrial interna, que conté nombroses crestes mitocondrials, permetria una expansió d'aquesta superior a la de l'externa, provocant el seu trencament. Es postulen dos models que explicarien l'inflament de la matriu mitocondrial. El primer es basa en l'observació a alguns sistemes d'una hiperpolarització de la membrana mitocondrial interna,  $\Delta\Psi_m$ , que precedeix a l'alliberament del Cit c. Aquesta hiperpolarització resultaria d'una incapacitat per bescanviar ATP mitocondrial per ADP citosòlic durant l'apoptosi. Aquest transport està mediat per VDAC (*Voltage-dependent anion channel*), localitzat a la membrana mitocondrial externa (Figura 3) (Desagher, 2000). El tancament o l'obertura de VDAC estarien regulats per proteïnes de la família de Bcl-2. En concret, es postula que Bcl-XL estimularia el seu tancament (Danial, 2004). Un segon mecanisme consistiria en la

formació d'un canal mitocondrial inespecífic, el PTP (*permeability transition pore*), localitzat als llocs de contacte entre les membranes mitocondrials interna i externa (Figura 3). Aquest canal estaria format per les proteïnes VDAC, ANT (*Adenylate translocator*) i ciclofilina D (Cyp-D) (Crompton, 1999). L'obertura del canal estaria propiciada per diversos efectors fisiològics com el  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfat inorgànic, espècies reactives d'oxigen (ROS), canvis de pH o baix  $\Delta\Psi_m$  (Desagher, 2000). Igualment s'ha descrit que diferents membres de la família de Bcl-2 poden intervenir en la regulació del PTP. En concret s'ha observat que Bcl-2 inhibeix la despolarització mitocondrial mentre que Bax i Bak, a través de la seva unió a ANT, promouen l'obertura del PTP (Desagher, 2000; Danial, 2004). Altres estudis indiquen que el Cit c pot ser alliberat de la mitocòndria abans o sense que es produeixi la pèrdua de  $\Delta\Psi_m$  (Kluck, 1997; Yang, 1997), és a dir, que seria un fenomen independent de l'obertura del PTP i l'inflament de la mitocòndria. L'obertura del PTP podria tenir lloc posteriorment a l'alliberament del Cit c com a conseqüència de l'activació en la que hi participarien les caspases (Marzo, 1998). S'ha postulat també l'existència de canals conductors de Cit c formats per membres proapoptòtics de la família Bcl-2 (Hengartner, 2000), o en cooperació amb VDAC (Shimizu, 1999; Desagher, 2000; Danial, 2004). Igualment, s'ha descrit que la peroxidació de la cardiolipina, fosfolípid de presència predominant a la membrana mitocondrial interna al que es troba associat el Cit c, és un primer pas crític per a la mobilització d'aquest (Orrenius, 2004).

### **2.3. L'apoptosoma.**

Apaf-1, caspasa-9 i Cit c són components crucials de la via apoptòtica intrínseca mitocondrial. L'oligomerització d'Apaf-1 induïda per Cit c i posterior reclutament de la caspasa-9, dóna lloc al complex macromolecular anomenat apoptosoma. La reconstitució *in vitro* amb Apaf-1, Cit c i caspasa-9 recombinants, van mostrar que el complex resultant és actiu en quant a la seva capacitat de processar i activar la PC-3 (Zou, 1997; Saleh, 1999; Zou, 1999). Més recentment, però, la naturalesa del apoptosoma s'ha revelat més complexa, i sembla que poden participar-hi d'altres proteïnes (Cain, 1999; Cain, 2000; Cain, 2001).

L'Apaf-1 juga un paper central a la formació d'aquest complex activador de l'apoptosi. Tant la proteïna aïllada de cèl.lules de mamífer com l'expressada de forma recombinant elueixen amb  $M_r = 130-300$  KDa a les columnes d'exclusió molecular, el que indicaria una estructura monomèrica o bé dimèrica. No obstant, després de l'activació de llisats cel.lulars amb dATP i Cit c, s'ha observat que l'Apaf-1 elueix com



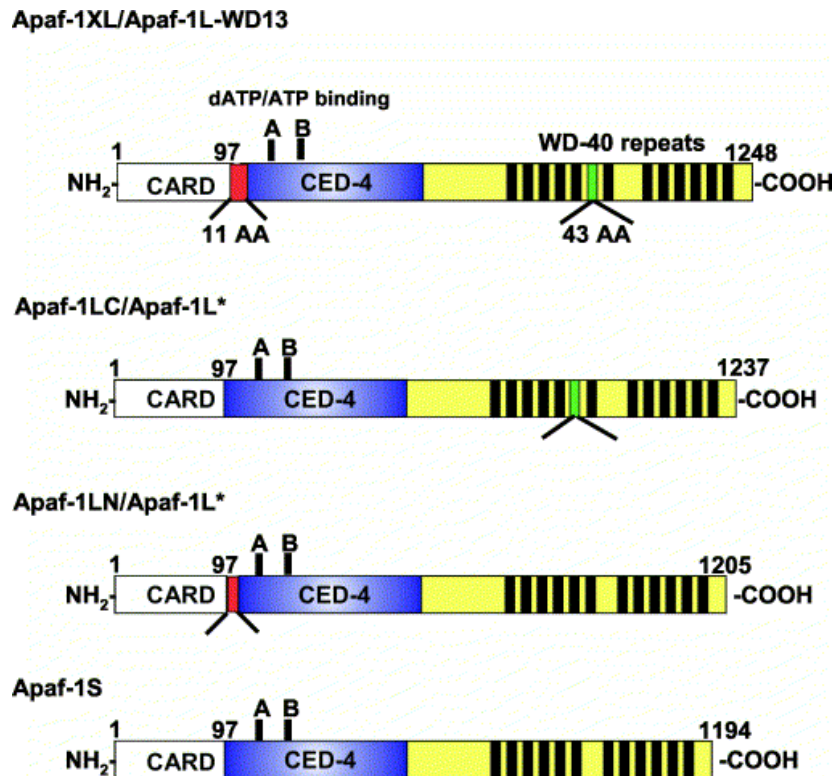
dos complexos amb Mr ~700 KDa i ~1,4 MDa (Zou, 1999), que contenen l'Apaf-1 i la caspasa-9 processada. El complex de ~700 KDa és el predominant a les cèl·lules apoptòtiques i el que presenta major activitat en processar les procaspases 9 i 3 exògenes (Cain, 2002). La menor activitat per al complex de ~1,4 MDa s'ha atribuït a una oligomerització incorrecta de l'Apaf-1, com evidencien experiments de digestió d'aquest complex, que posen de manifest una conformació diferent per a aquesta proteïna, així com la formació d'aquests complexos inactius en incubar lisats cel·lulars en absència de Cit c i dATP (Bratton, 2001). Aquesta oligomerització seria una capacitat inherent de l'Apaf-1, que és capaç de donar lloc a un nombre de complexos inactius de diferent mida, però la presència de Cit c i dATP afavoreix la formació del complex actiu de ~700 KDa.

A més dels elements centrals que constitueixen l'apoptosoma, diversos estudis han posat de manifest la participació de les caspases 3 i 7 (Cain, 1999; Bratton, 2001a), així com de XIAP i d'altres (Hill, 2004), si bé aquests components podrien unir-se amb una afinitat menor (Cain, 2002) i de forma transitòria (Twiddy, 2004).

### 2.3.1. Apaf-1: el component principal de l'apoptosoma.

Apaf-1 és una proteïna d'uns 130 KDa, que comprèn un domini *N*-terminal d'unió a caspases CARD, seguit d'un domini central NOD (*Nucleotide oligomerization domain*), amb homologia a Ced-4, i un domini *C*-terminal (WDR), que conté múltiples (12 o 13) repeticions WD40. S'han clonat i identificat quatre isoformes d'Apaf-1 (Benedict, 2000; Cain, 2002), conegudes com Apaf-1-S (Zou, 1997), Apaf-1-XL o Apaf-1-L-WD13 (Hu, 1999), Apaf-1-LN (Benedict, 2000), i Apaf-1-LC o Apaf-1-L (Saleh, 1999). Aquestes isoformes difereixen per la presència/absència de dues insercions de 11 aa, a continuació del domini CARD, i 43 aa, corresponent a una repetició WD40 addicional al WDR (Figura 4).

El cADN d'Apaf-1 clonat per primera vegada pel grup de X. Wang (Zou, 1997) codifica per 1194 aa i correspon a la isoforma Apaf-1-S. Aquesta isoforma no conté cap de les dues insercions esmentades (Figura 4). Tot i haver estat reportada inicialment com a capaç d'activar PC-3, estudis posteriors van fer palesa la incapacitat d'aquesta isoforma per activar PC-3, prèvia activació de PC-9 (Benedict, 2000). Només les isoformes que contenen la inserció d'una repetició WD-40 addicional, Apaf-1-L i Apaf-1-XL, són capaces de promoure l'activació proteolítica de PC-9, dependent de Cit c i dATP, com es posa de manifest per l'aparició del fragment p35 indicatiu de la degradació proteolítica de PC-9 (Zou, 1999; Saleh, 1999; Benedict, 2000).



**Figura 4.** Representació esquemàtica dels dominis de les diferents isoformes d'Apaf-1 (Cain, 2002). \*Dues isoformes han estat referides com Apaf-1-L (Zou, 1999; Saleh, 1999).

Les repeticions WD-40 estan constituïdes per una seqüència de 44-60 residus, que conté el dipèptid GH a 11-24 residus de l'extrem *N*-terminal i el dipèptid WD a l'extrem *C*-terminal, i adopten una estructura de  $\beta$ -propeller (Smith, 1999). Generalment, les estructures  $\beta$ -propeller contenen 4-8 fulles  $\beta$ . El domini WDR de les isoformes d'Apaf-1 amb 13 repeticions, s'organitzaria com dos  $\beta$ -propeller asimètrics, un de 7 fulles i l'altre de 6. Aquests tipus de dominis participen en interaccions proteïna-proteïna, formant complexos reversibles i coordinant varies proteïnes de forma seqüencial o simultània (Smith, 1999).

Els dominis CARD presenten un plegament consistent en 6 hèlix  $\alpha$  que es troba a proteïnes adaptadores i a les caspases (Hofmann, 1997). A aquestes actua com una regió d'ancoratge que permet a les caspases iniciadores agregar-se a través de proteïnes adaptadores, facilitant així la seva activació. A Apaf-1 els residus 1-97 formen un domini CARD que recluta la PC-9. El domini CARD d'Apaf-1 no es troba exposat i no pot interaccionar amb PC-9 a no ser que l'Apaf-1 sigui activada per dATP i Cit c (Li, 1997). Mutants derivats de l'Apaf-1 on s'ha eliminat aquesta regió, no són capaços d'activar la PC-9, mentre que mutants resultants de la deleció del domini

WDR són constitutivament actius i capaços d'activar la PC-9 en absència de dATP i Cit c (Srinivasula, 1998; Hu, 1998). Aquests resultats van suggerir que l'accés al domini CARD està normalment bloquejat pel domini WDR, i que el dATP i el Cit c promouen un canvi conformacional a l'Apaf-1 que exposa el domini CARD, permetent la seva interacció amb la PC-9. El paper de la inserció d'onze residus entre el domini CARD i el CED-4 a algunes de les isoformes d'Apaf-1 no és clar, donat que l'Apaf-1-LC/Apaf-1L és funcional en quant a la unió del Cit c i l'activació de la caspasa-9.

El domini NOD o CED-4, que comprèn els residus 94-412, presenta els motius consens de caixes Walker A (*P-loop*) i B, característics d'ATPases, constituint un lloc d'unió de nucleòtids (Li, 1997). S'han obtingut resultats contradictoris en estudis per determinar si la hidròlisi d'ATP és un requisit per a la funció d'Apaf. Així, en assaigs duts a terme amb ATP $\gamma$ S, anàleg no hidrolitzable de l'ATP, no s'observà l'oligomerització d'Apaf-1 o la unió a PC-9, suggerint que la hidròlisi seria requerida per a la formació de l'apoptosoma i l'activació de la PC-3 (Hu, 1999; Zou, 1999; Saleh, 1999). Per altra banda, l'anàleg no hidrolitzable  $\beta,\gamma$ -metilenadenosin-5'-tiofosfat (ADPCP), a diferència de l'ATP $\gamma$ S, s'ha mostrat capaç d'activar l'Apaf-1 (Jiang, 2000). No obstant, les dades obtingudes per cristal·lització del mutant de deleció Apaf-1(1-591), on s'ha eliminat el domini WDR, van fer palesa una activitat ATPàsica per a l'Apaf-1 així com el requeriment de la hidròlisi del nucleòtid per a la formació de l'apoptosoma (Riedl, 2005). La concentració cel·lular de dATP i ATP és 10-20  $\mu$ M i 0,2-1 mM, respectivament. La  $K_d$  per a la unió del dATP a Apaf-1 de només 1,7  $\mu$ M, suggereix que els dos nucleòtids podrien contribuir a l'oligomerització d'Apaf-1 dependent de Cit c (Jiang, 2000).

El fet que mutants truncats d'Apaf-1 als que els hi manca el domini WDR (Apaf-1(1-530) i Apaf-1(1-570)) oligomeritzin, reclutin i processin la procaspasa-9 de forma independent de l'ATP/dATP, va suggerir que els llocs d'unió a nucleòtid estan involucrats en eliminar l'efecte inhibitori del domini WDR, el qual regularia la capacitat d'Apaf-1 d'autoassociar-se a través del seu domini NOD/CED-4 (Srinivasula, 1998; Hu, 1999; Adrain, 1999).

Els apoptosomes derivats d'aquests mutants truncats d'Apaf-1 no són capaços de reclutar ni activar la caspasa-3, el que indica que el domini WDR podria també jugar un paper important en el reclutament de la procaspasa-3 al complex (Hu, 1999; Cain, 2002). Aquestes i d'altres observacions van portar a proposar que, en absència de Cit c i dATP, el domini WDR estaria plegat sobre el NOD/CED-4 emmascarant les seves

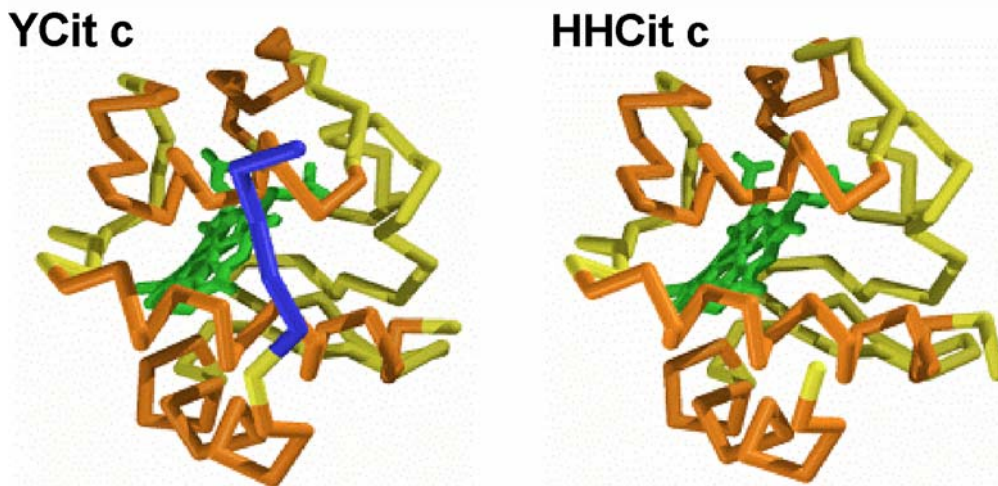
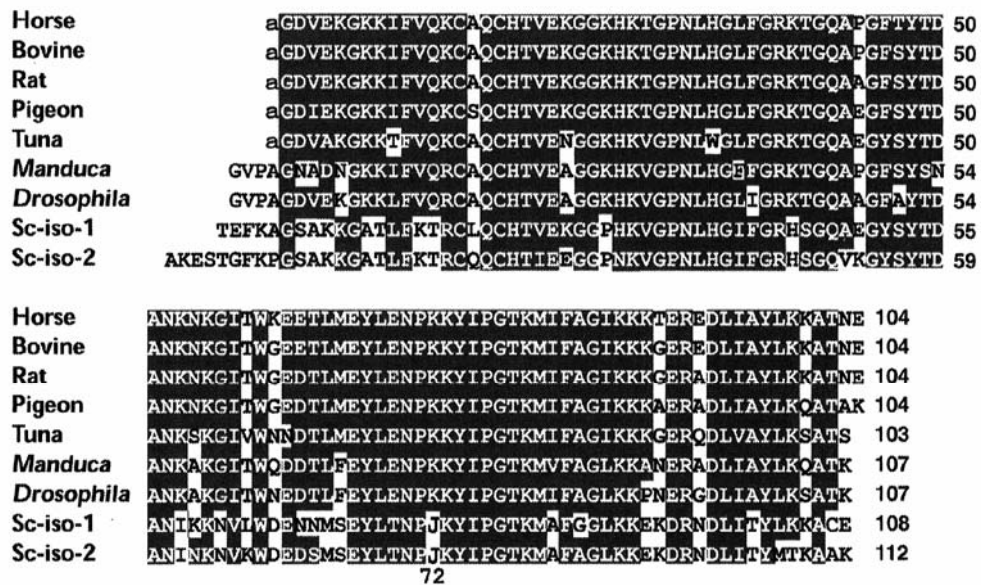
superfícies d'interacció i impeding l'oligomerització en que aquestes estan involucrades (Hu, 1999).

### **2.3.2. Citocrom c: l'inductor de la formació de l'apoptosoma.**

El citocrom c (Cit c), alliberat des de la mitocòndria en resposta a estímuls proapoptòtics, és el lligand reconegut pel domini WDR de l'Apaf-1. Aquesta proteïna, que va ser descrita per primer cop al 1930 per Keilin (Keilin 1930), es sintetitza al citoplasma i l'apoCit c resultant, que no conté el grup hemo, és importat a la mitocòndria on té lloc l'addició post-traducciona d'aquest grup prostètic, catalitzada per una hemoliasa, la qual dóna lloc a l'holoproteïna (Martin, 2004). El grup hemo és necessari perquè la proteïna adopti un plegament tridimensional correcte (Dumont, 1994). Durant més de 60 anys s'havia suposat que la funció principal d'aquesta proteïna era la de transportar electrons des del complex bc<sub>1</sub> a la citocrom c oxidasa, dintre la cadena respiratòria d'eucariotes. El descobriment de la seva participació en un dels punts de regulació de l'apoptosi va ser, per tant, una observació inesperada que ha revifat l'interès en aquesta proteïna als darrers anys.

Successius treballs apareguts a la literatura van posar de manifest algunes característiques de la interacció de Cit c amb Apaf-1. Així, es va determinar que aquesta no depèn de la capacitat del citocrom per transferir electrons i que la microperoxidasa-11, fragment peptídic que manté la unió covalent al grup hemo i que s'obté per degradació del Cit c amb pepsina, així com el Cit c desnaturalitzat o derivats de Cit c on s'ha eliminat el grup hemo, no posseeixen activitat proapoptòtica (Kluck, 1997). D'altra banda, es va determinar que els citocroms nadius de diferents espècies de vertebrats (humà, vaca, cavall, colom o tonyina) són equivalents en quant a la seva capacitat per induir l'apoptosi en sistemes *in vitro*, mentre que el de llevat (YCit c) no presenta aquesta activitat inclús a concentracions 100 vegades superiors a les necessàries amb els citocroms d'altres espècies (Kluck, 1997). Aquest darrer resultat va ser sorprenent si es té en compte que YCit c sí és capaç de suplir les funcions dels citocroms d'organismes superiors a la cadena respiratòria de transport electrònic. Se sap que aquesta funció com a transportador electrònic està mediada per un epítip d'unió conservat al citocrom, que consisteix en una superfície rica en residus de Lys i Arg que estableixen interaccions electrostàtiques amb residus d'Asp i Glu presents a les proteïnes amb les que s'aparella (Pelletier, 1992). De fet, Cit c és una de les proteïnes evolutivament més conservades (Figura 5), sent l'homologia entre el d'origen humà i les dues isoformes (iso-1 i iso-2) del de llevat superior al 60 %. Tot i

així, la manca de capacitat proapoptòtica d'aquestes darreres indicava que diferències subtils a la seva estructura eren determinants d'aquesta activitat.



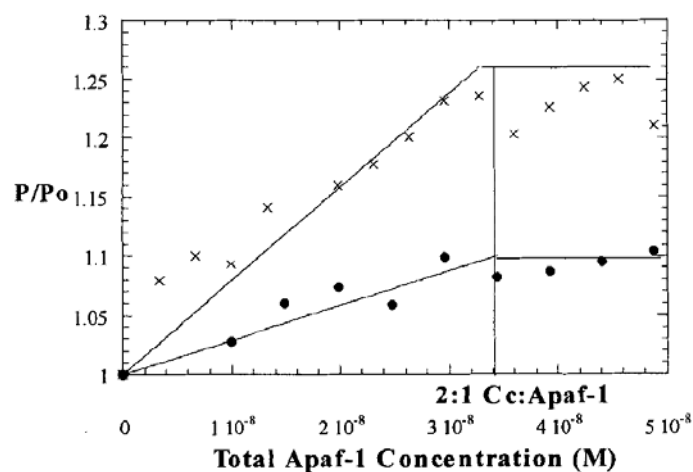
**Figura 5.** Dalt: Alineament de les seqüències dels citocroms c de diferents espècies. Les regions ombrejades indiquen similitud de seqüència. La numeració que s'emprarà en aquesta memòria per a la seqüència del Cit c es correspon amb la dels eucariotes superiors, resultant en números negatius per a l'extensió *N*-terminal del YCit c. Baix: Comparació de l'estructura dels citocroms c de llevat (YCit c) i de cor de cavall (HHCit c). En verd es destaca el grup hemo c, en taronja les regions estructurades en hèlix  $\alpha$ , i en blau la cua de 5 residus a l'extrem *N*-terminal de l'iso-1 YCit c.

La regió *N*-terminal dels citocroms presenta una certa variabilitat. Així els citocroms de vertebrats comencen amb una acetilglicina a la posició 1, mentre que els d'insectes i llevats presenten una extensió d'uns quants residus, cinc en els cas de

l'iso-1 Cit c de llevat (YCit c)<sup>1</sup> (Figura 5). A més, a la majoria de llevats, però no a organismes superiors, el residu Lys72 és modificat post-traduccionalment per addició de tres grups metil al grup  $\epsilon$ -amino, prèviament a la translocació a la mitocòndria. El fet que aquest residu estigui localitzat a una regió altament conservada, que correspon a la cara de la molècula que intervé a gairebé totes les interaccions del Cit c amb altres proteïnes de transport electrònic com la citocrom c oxidasa o el complex citocrom bc<sub>1</sub>, va fer plantejar aquesta lisina com una candidata a ser clau també a la interacció amb Apaf-1 (Kluck, 2000).

### 2.3.3. Interacció entre Apaf-1 i citocrom c.

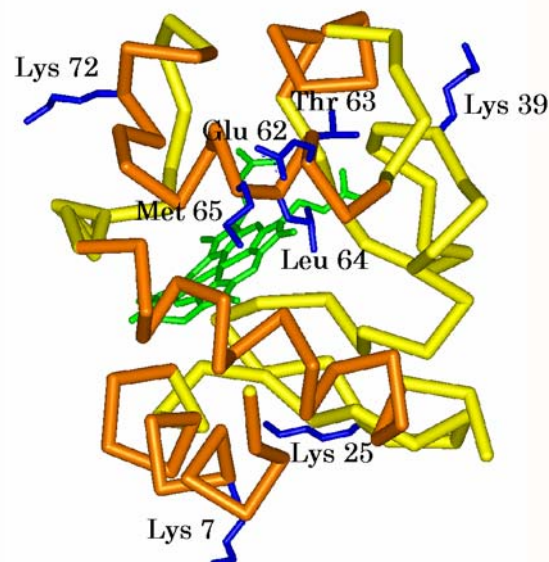
Estudis de polarització de fluorescència (Figura 6) amb un derivat fluorescent de HHCit c en el que es va substituir l'àtom metàl·lic del grup hemo per Zn<sup>2+</sup> (Zn-HHCit c), el qual dóna lloc a una espècie fluorescent estructuralment equivalent al citocrom natiu, van indicar que aquest interacciona fortament amb Apaf-1 amb una estequiometria aparent 2:1 Cit c-Apaf (Purring, 1999). En les condicions de baixa força iònica ( $\mu \sim 10$  mM) de l'assaig, la constant d'afinitat estimada era de l'ordre de  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , valor que indicava una elevada especificitat de la interacció entre les dues proteïnes i, per tant, un estricte requeriment per a que les dues estructures encaixin una amb l'altra de forma precisa (Abdullaev, 2002).



**Figura 6.** Titració de Zn-HHCit c (75 nM) amb Apaf-1 en presència (x) o absència (●) de dATP (100  $\mu$ M), i monitorització de la polarització de fluorescència ( $\lambda_{\text{ex}} = 550$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 587$  nm). Experiments realitzats amb tampó de baixa força iònica (20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,5) (Purring-Koch, 2000).

<sup>1</sup> En general, a la resta de la memòria, quan es faci menció del Cit c de llevat (YCit c) es fa referència a l'iso-1-YCit c.

Estudis posteriors van indicar que aquesta interacció és fortament depenent de la força iònica del medi, estimant-se que en condicions fisiològiques ( $\mu \sim 150 \text{ mM}$ ) el seu valor aproximat es de  $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , consistent amb la dependència que mostra el citocrom en la unió amb altres *partners* fisiològics (Purring-Koch, 2000). Aquest resultat recolzava també la participació de la superfície fortament carregada, on es troba el costat exposat del grup hemo, present al citocrom. Aquesta regió conté 11 residus de Lys que poden establir interaccions electrostàtiques amb residus carregats negativament del domini WDR d'Apaf-1. Kluck i col. van establir la participació del residu Lys72 de HHCit c com una contribució important a la interacció amb Apaf-1 (Kluck, 2000). Donat que, com ja s'ha esmentat, aquest residu es troba en forma trimetilada als citocroms de llevat, això constituïa una possible explicació, encara que no suficient, per a la manca d'activitat proapoptòtica dels citocroms de llevat. En un treball publicat poc més tard, es van reportar les activitats proapoptòtiques (activació de PC-3) d'un nombre de mutants de HHCit c i YCit c, el qual va permetre identificar quins són els residus essencials per a la interacció amb Apaf-1 (Yu, 2001). Així, es va determinar que les lisines 7, 25, 39 i 72, i els residus 62-65 dels citocroms de mamífers, participen a la interacció amb Apaf-1 (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de HHCit c on es destaquen (color blau) els residus que participen a la interacció amb Apaf-1 (Yu, 2001).

La mutació d'aquests residus al HHCit c condueix a una pèrdua progressiva de la capacitat per promoure l'activació de PC-3, mentre que la introducció d'aquests residus a la seqüència del citocrom de llevat i la supressió de la cua de 5 residus extra

a l'extrem *N*-terminal, de forma que s'aproxima la seqüència de YCit c a la del de mamífers, comporta un augment de la seva capacitat proapoptòtica, que pot arribar a igualar la d'aquells (Yu, 2001). Aquests residus es troben repartits al llarg de tota la superfície del Cit c, indicant un reconeixement que involucra una gran part de la superfície de la proteïna. La interacció amb tots aquest residus requereix per tant, que el domini d'interacció a l'Apaf envolti gairebé tot el citocrom, establint un elevat nombre de contactes. Treballs posteriors realitzats amb citocrom c humà van permetre determinar també la participació a aquesta proteïna, de les lisines en posicions 13, 39, 72 i 86 a la interacció amb Apaf-1 (Olteanu, 2003).

D'altra banda, estudis amb apo-Cit c, al que li manca el grup hemo i presenta una estructura de cabdell estadístic, van fer palesa la seva capacitat per unir-se de forma reversible a Apaf-1 amb una afinitat similar a la de l'holoproteïna i que, tot i ser ineficaç en promoure l'activació de caspases, es capaç de bloquejar l'activació de PC-9 i PC-3 induïda per l'holo-Cit c (Martin, 2002, 2004). Aquestes observacions suggeriren la possibilitat de bloquejar la interacció entre Cit c i Apaf-1 com una diana factible per modular l'apoptosi.

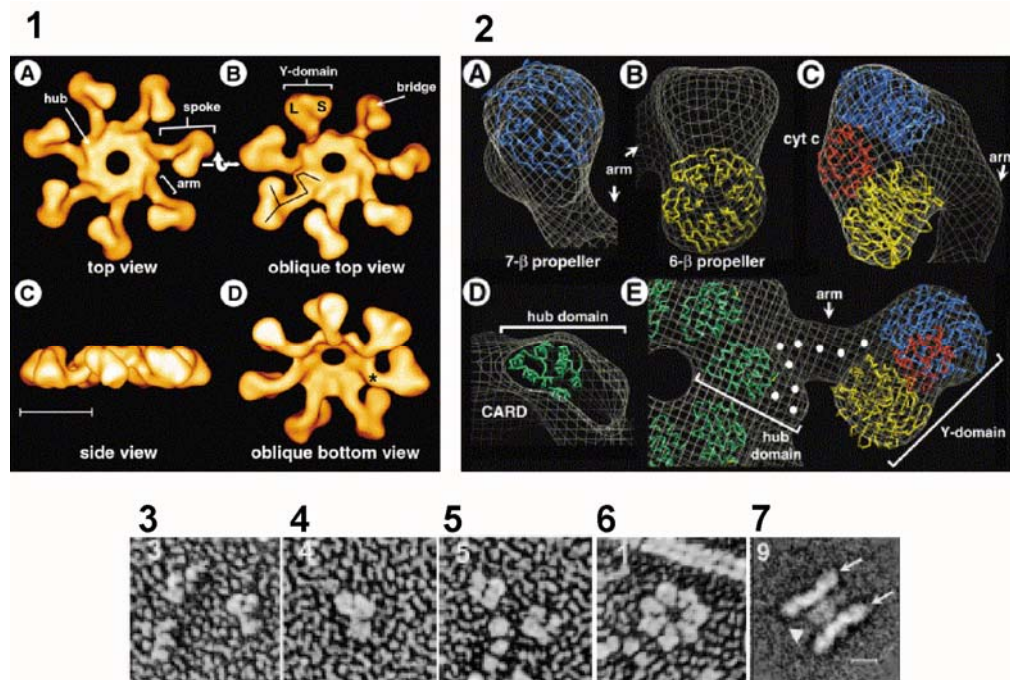
#### **2.3.4. Interacció amb caspasa-9: estructura de l'apoptosoma.**

L'estequiometria d'unió de l'Apaf-1 i la caspasa-9 es suposava 1:1, com s'esperaria de l'elevada afinitat de les interaccions entre els dominis CARD d'ambdues proteïnes (Zou, 1999). El domini CARD d'Apaf-1 uniria el CARD de la caspasa-9 mitjançant una barreja d'interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques, resultant en una unió molt estable inclús en condicions de força iònica elevada (Qin, 1999). El zimogen de la procaspasa-9 s'uniria a Apaf-1, seria activat i uniria una molècula de procaspasa-9 veïna, que es reestructuraria per formar el centre actiu (Srinivasula, 1998).

Estudis de criomicroscòpia electrònica van permetre resoldre l'estructura tridimensional de l'apoptosoma a baixa resolució (27 Å) (Acehan, 2002), revelant que es tracta d'una partícula amb forma de roda amb set radis simètrics amb forma de Y, estructurats entorn un eix central (Figura 8). El domini central (*hub domain*) es connecta amb el domini en Y mitjançant un braç. En base a aquesta estructura, es proposa un model on cada molècula d'Apaf-1 contribueix a l'eix, al braç i al domini Y. Aquest darrer consta de dos dominis globulars asimètrics, amb la mida i la forma corresponents a un  $\beta$ -*propeller*, pel que es proposa que correspondria al WDR de l'Apaf-1. El domini globular més gran d'aquests dos correspondria a un domini constituït per 7 fulles  $\beta$  i el petit pot encabir un altre format per 6 fulles  $\beta$ . A la cavitat



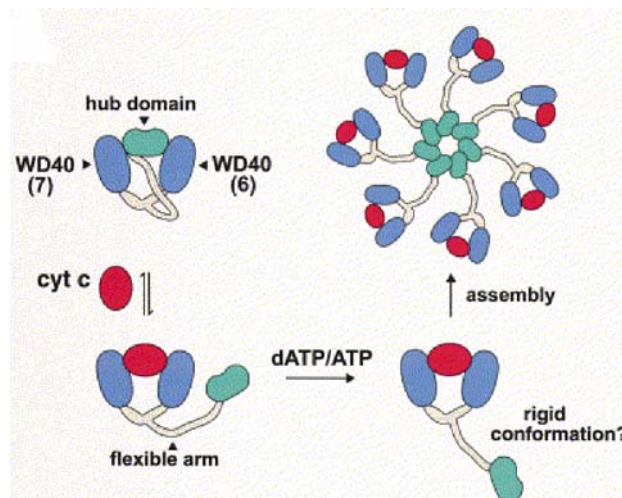
situada entre els dos dominis globulars hi ha prou espai per encabir una molècula petita, com el Cit c. El domini CARD es situaria a la part superior de l'eix central. Aquesta disposició del domini CARD de l'Apaf-1 permetria la interacció amb el domini CARD de la procaspasa-9, sense que aquesta afectés l'estructura de l'apoptosoma. El domini CARD s'estendria cap a l'exterior per formar un braç que comprendria el domini NOD/CED-4, el qual també contribuiria a l'eix central i a la regió que s'uneix als dominis globulars WDR. Segons aquest model, els motius d'unió de nucleòtids estarien probablement localitzats entre l'eix central i la regió proximal del braç. Així, la unió dels nucleòtids regularia la constitució de l'apoptosoma, donat que la regió que conté les caixes Walker interaccionaria directament amb el CARD d'Apaf-1, i també estaria en contacte amb el domini NOD/CED-4 del monòmer adjacent.



**Figura 8.** Model tridimensional de l'apoptosoma obtingut per criomicroscòpia electrònica. (1) Estructura tridimensional de l'apoptosoma. Els dominis CARD de les set molècules d'Apaf-1 es troben units formant part d'un eix central des del que es projecten set radis formats pels dominis WDR. (2) Seqüència i disposició dels motius estructurals de l'Apaf-1 i del Cit c dins l'apoptosoma. (3-5) Micrografies electròniques de l'Apaf-1 monomèrica, amb estructura en forma de Y (3 i 4) o compacta (5), de l'apoptosoma oligomeritzat (6) i de dos apoptosomes (7). Entre ells, assenyalats per les fletxes, s'aprecia la presència de proteïnes que podrien correspondre a la caspasa-9 (Acehan, 2002).

En base a aquesta estructura de baixa resolució i les dades bioquímiques disponibles (Liu, 1996; Goldstein, 2000), es va proposar un model per a la formació de l'apoptosoma funcional que requereix d'una seqüència d'esdeveniments (Acehan, 2002) (Figura 9). L'Apaf-1 es troba normalment en una conformació autoinhibida en la que

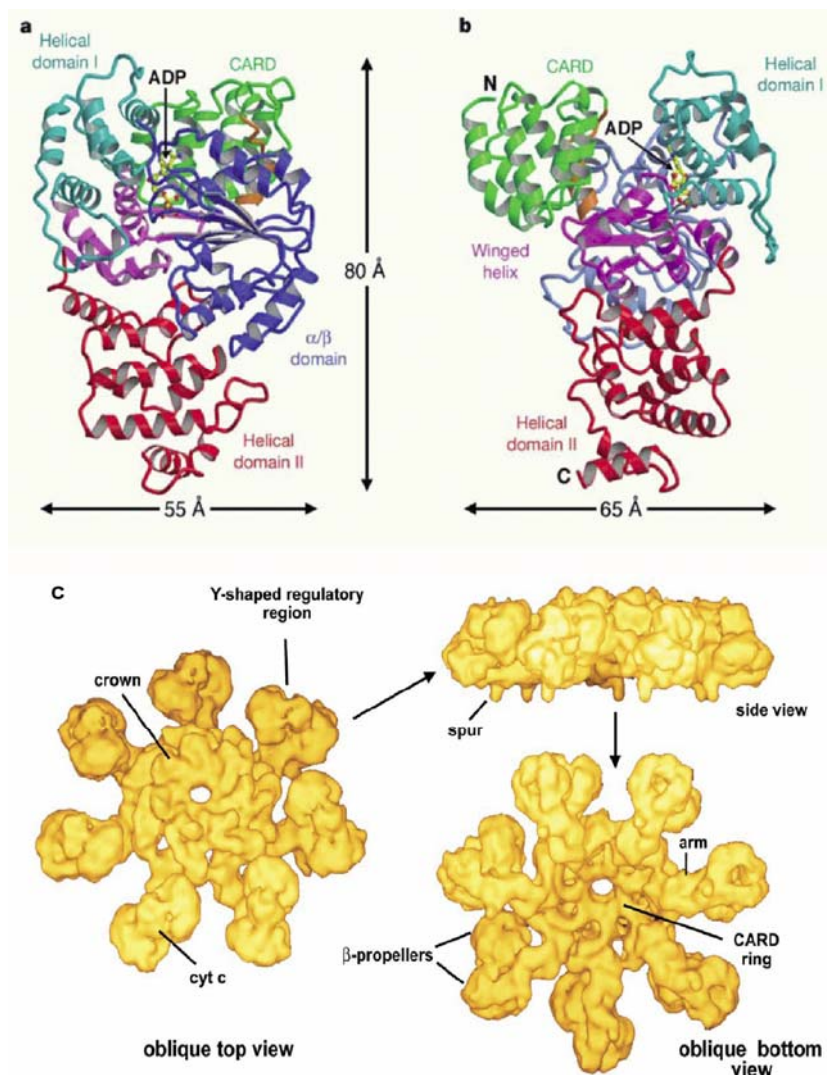
el domini WDR és el responsable de mantenir aquest estat. El CARD d'Apaf-1, amb una mida similar a la del Cit c, encaixaria entre els dos  $\beta$ -*propeller* del domini WDR (Acehan, 2002) per donar lloc a aquesta conformació compacta inactiva. Quan el Cit c s'allibera des de la mitocòndria, s'uniria a l'Apaf-1 (Liu, 1996; Zou, 1997; Hu, 1999) desplaçant el domini CARD del seu lloc d'unió entre els dos dominis globulars del WDR, el que permetria alhora l'accés al lloc d'unió del dATP/ATP al domini NOD/CED-4. D'aquesta manera, els dominis que constitueixen l'eix central quedarien lliures per poder associar-se. A continuació, es produiria la unió del nucleòtid al NOD/CED-4, que promouria un canvi conformacional i fixaria aquest domini en una conformació més estesa, impedint així la reassociació del CARD amb els  $\beta$ -*propellers*. En una darrera etapa, la procaspasa-9 s'uniria al CARD de l'Apaf-1, que es trobaria accessible, per formar un apoptosoma actiu. Això suposaria que el braç de l'Apaf-1 hauria de disposar d'una juntura flexible que es tornaria més rígida per efecte de la unió del dATP/ATP. El lloc d'unió de nucleòtid estaria localitzat a la regió compresa entre l'eix central i la regió proximal del braç, de forma que canvis conformationals associats a la unió de dATP/ATP es podrien transmetre tant a l'eix central com al braç.



**Figura 9.** Model proposat per a la formació de l'apoptosoma (Acehan, 2002).

La selecció evolutiva del Cit c com a element clau per promoure la formació de l'apoptosoma vindria donada, a més pel fet que estigui localitzat a l'interior de la mitocòndria i només sigui alliberat al citosol en resposta a un estímul apoptòtic, a que és similar en mida i forma al domini CARD i la regió globular de NOD/CED-4 localitzades a l'eix central de l'estructura observada per a l'Apaf-1. Així permetria una regulació de l'ensamblatge de l'apoptosoma mitjançant un mecanisme de desplaçament físic. La presència i unió de la procaspasa-9 al CARD, un cop aquest

domini ha estat desplaçat pel Cit c, impedirà la seva reassociació amb els  $\beta$ -propellers i afavoriria la unió del nucleòtid al domini NOD/CED-4, en permetre que aquest adoptés conformacions amb una afinitat més elevada pel nucleòtid (Jiang, 2000). Donat que l'estequeometria del CARD de l'Apaf-1 respecte el CARD de la procaspasa-9 és 1:1 (Zou, 1999; Qin, 1999), es requeririen set molècules de procaspasa-9 per saturar els llocs d'unio de l'apoptosoma. Així, l'elevada concentració de procaspasa-9 entorn l'eix central del complex, facilitaria el reclutament de monòmers inactius, en solució, per formar dímers. Cadascun d'aquest dímers contindria un lloc catalític actiu, que estaria localitzat distant de l'eix central de l'apoptosoma, on hi hauria menor impediment estèric per a la unió del seu substrat. el que afavoriria la proteòlisi de la procaspasa-3, en promoure la unió de múltiples zimògens a l'apoptosoma, augmentant així l'eficiència de la seva activació. Donat que tant la procaspasa-9 (Acehan, 2002) com la caspasa-9 (Rodríguez, 1999; Stennicke, 1999) són capaces de formar dímers actius a l'apoptosoma, seria possible la formació de complexos de major entitat molecular resultants de la interacció entre dos apoptosomes (Figura 8, 7).



**Figura 10. a, b:** Estructura de raigs-X determinada per a la construcció Apaf-1(1-591) unida a ADP. Es detallen 5 dominis seqüencials que comprenen: CARD (verd), plegament  $\alpha/\beta$  (blau), domini helicoidal I (cian), domini *winged-helix* (magenta) i domini helicoidal II (vermell). (Riedl, 2005). **c:** Estructura tridimensional obtinguda per criomicroscòpia a 12,8 Å de resolució de l'apoptosoma humà (Yu, 2005).

La publicació més recentment de l'estructura de la construcció Apaf-1 (1-591) unida a ADP (Riedl, 2005) i de l'apoptosoma a més elevada resolució (12,8 Å) (Yu, 2005), han donat més detalls sobre l'estructura del macrocomplex i sobre el seu mecanisme de formació, que concorda essencialment amb l'inicialment proposat per Acehan i col. (Acehan, 2002). Així, es confirma que l'apoptosoma adopta una estructura similar a una roda de set radis (Acehan, 2002), on els CARDS *N*-terminals de les set molècules d'Apaf-1 formen un anell central, que constitueix el centre actiu de l'apoptosoma. A partir d'aquest anell central s'estén la regió reguladora de cada molècula d'Apaf-1, constituïda pels dominis NOD/CED4 i el WDR. Al domini *C*-terminal WDR es troba només una única molècula de Cit c, que està unida a la cavitat formada pels dos  $\beta$ -propellers. Cada domini CARD està en contacte amb el domini NOD/CED4, i en concret el domini helicoidal I d'aquest darrer (Riedl, 2005) es situa sobre l'anell CARD, bloquejant l'accés de la procaspasa-9. Els altres dos dominis que constitueixen el NOD/CED4, plegament  $\alpha/\beta$  o NBD (*Nucleotide binding domain*) i *Winged-helix*, juntament amb el domini helicoidal 2, s'estructuren de forma cilíndrica al voltant de l'anell central CARD, constituint un domini NOD/CED4 funcional. El domini helicoidal 2 s'estén des del centre de l'apoptosoma conduït fins el domini *C*-terminal de la regió reguladora, format pels  $\beta$ -*propellers* del WDR, que s'organitzen formant una cavitat on encaixa el Cit c.

El monòmer d'Apaf-1 adoptaria una conformació compacta, amb el domini WDR bloquejant el NOD/CED-4, que estaria estructurat al voltant d'una molècula de dATP (Acehan, 2002; Riedl, 2005). La unió, amb una elevada especificitat, del Cit c a la regió reguladora constituïda pels WDR, permetria l'alliberament del NOD/CED4, conduït a una conformació més estesa de l'Apaf-1. El Cit c igualment actuaria com una proteïna activadora de l'activitat dATPasa, donat que la seva unió igualment estaria relacionada amb l'hidròlisi del dATP per part del monòmer d'Apaf-1 (Kim, 2005), que conduiria al intermedi amb dADP unit reportat per Riedl i col. (Riedl, 2005). En aquest sentit, ja s'havia descrit que la unió del dATP a l'Apaf-1 era incrementada en presència de Cit c i PC-9 (Jiang, 2000; Liu, 1996). L'addició de dATP posterior a la unió del Cit c, facilitaria el bescanvi del nucleòtid promovent la reorganització dels dominis CARD i NOD/CED4, de forma que es generaria una segona conformació unida a dATP, que seria capaç d'oligomeritzar (Yu, 2006). Val a dir que la substitució del dATP per anàlegs no hidrolitzables en aquesta etapa, no afecta la formació de l'apoptosoma (Jiang, 2000; Yu, 2005).

Aquest model de l'apoptosoma, en que els dominis que constitueixen la regió central NOD/CED4 de l'Apaf-1 adopten una estructura que condueix a un NOD funcional, i juguen un paper clau a la formació d'un apoptosoma actiu, es podria extrapolar a altres proteïnes de bacteries, animals o plantes, que contenen un domini NOD a la seva seqüència, i que igualment són capaces de formar complexos d'elevat pes molecular en resposta a diferents estímuls (Inohara, 2003). En aquest sentit, recentment ha estat reportada l'estructura tridimensional d'un apoptosoma a *Drosophila*, resultant de l'oligomerització de Dark (*Drosophila Apaf-1 related killer*), que condueix a la conseqüent activació de la procaspasa Dronc (Yu, 2006).

### 3. NOD (*Nucleotide oligomerization domain*): motiu involucrat a la regulació de l'apoptosi i a la defensa de l'hoste front a patògens.

#### 3.1. Mecanismes de resistència a patògens.

La recent identificació de proteïnes de la família NOD ha permès avançar en la comprensió de la funció d'aquest domini a la regulació de l'apoptosi i de la resposta immune.

Quan el factor regulador de l'apoptosi Apaf-1 va ser identificat, es va constatar la seva elevada homologia estructural amb una sèrie de factors citosòlics producte dels gens R de resistència a malalties de plantes (Koonin, 2000). Cada gen R protegeix la planta enfront de patògens específics mitjançant el reconeixement, a través dels seus dominis LRR (*Leucine rich repeats*) C-terminal, de components derivats d'aquells, anomenats Avrs (*Avirulence factors*), de forma que variacions genètiques als LRR determinen l'especificitat de les proteïnes R. El reconeixement dels Avrs pot conduir a l'activació de l'apoptosi i dels mecanismes d'estrès antibacterià (Chisholm, 2006). Així, tant l'Apaf-1 com les proteïnes R citosòliques de plantes, regulen la mort programada de la cèl.lula a través del seu domini C-terminal en resposta a lligands específics (Inohara, 2001).

D'una banda es poden distingir proteïnes R que reconeixen Avrs a la superfície cel.lular, i contenen un domini transmembrana i domini LRR extracel.lular. Les proteïnes R de plantes associades a membrana presenten una elevada homologia estructural amb els TLRs (*Toll-like receptors*). Els TLRs són factors del sistema immune innat que participen en el reconeixement de patògens a vertebrats. A mamífers s'ha demostrat la implicació dels TLRs als mecanismes de defensa contra patògens, mitjançant el reconeixement per part dels seus dominis LRR extracel.lulars de components bacterians específics (Inohara, 2002). D'altra banda les proteïnes R

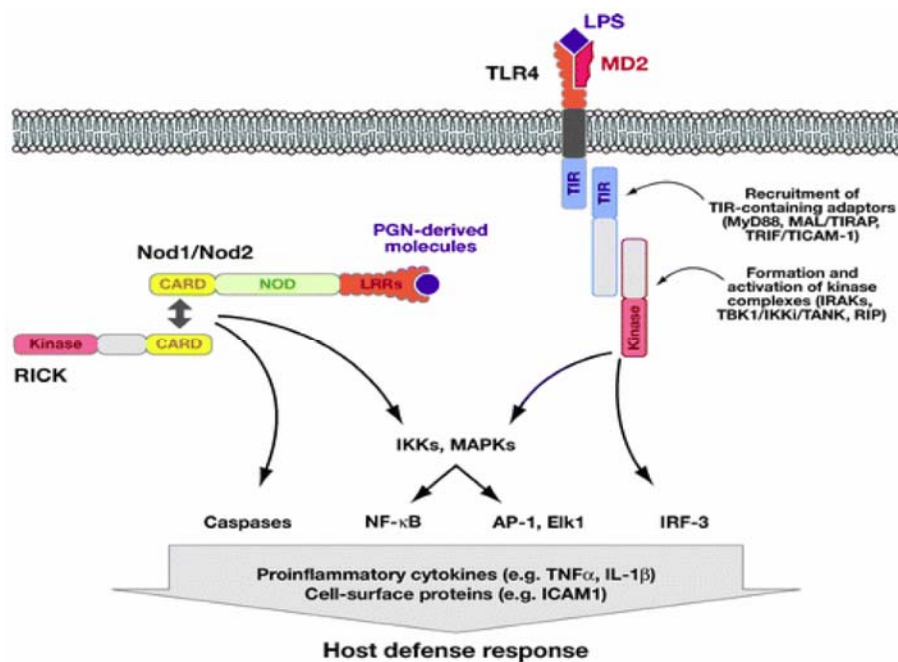
citosòliques, que contenen un domini *N*-terminal ric en hèlix- $\alpha$ , un domini central NOD i LRRs *C*-terminals, reconeixen els Avrs injectats a la cèl.lula de l'hoste conduint a l'activació de l'apoptosi o dels mecanismes de resposta a patogen de la cèl.lula.

L'homologia estructural entre les proteïnes R citosòliques i proteïnes NOD-LRR de mamífer, fa pensar en el paper d'aquestes al reconeixement de components derivats de patògens al citosol de les cèl.lules de mamífer. La detecció i eliminació d'agents infecciosos resulta fonamental per a la supervivència dels organismes multicel.lulars. El sistema immune ha desenvolupat múltiples mecanismes per tal d'identificar, neutralitzar i eliminar els patògens, que de forma general es poden dividir en la immunitat innata i l'adquirida. El sistema immune innat és present a tots els organismes multicel.lulars i està mediat principalment per immunòcits amb capacitat per destruir una gran varietat de patògens. Durant els primers dies de la infecció, el sistema immune innat juga un paper molt important en el desenvolupament de la resposta immune adquirida, mediada pels limfòcits T i B, els trets principals dels quals són la seva memòria i especificitat. El sistema immune innat constitueix la primera línia de defensa contra el microbis, que inclou l'activació i reclutament de cèl.lules fagocítiques cap als llocs on s'està produint la infecció. Molècules especialitzades del sistema immune innat reconeixen components conservats dels microorganismes que no es troben a l'hoste i estimulen la resposta immune (Inohara, 2005; McDonald, 2005).

Tant a plantes com a animals la detecció inicial d'agents microbians depèn de receptors cel.lulars especialitzats que reconeixen molècules que s'expressen exclusivament a bacteris o PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) (Figura 11). Als animals, la detecció dels agents microbians té lloc mitjançant el reconeixement dels PAMPs per part de receptors específics presents a l'hoste o PRRs (*Pattern-recognition receptors*). En concret, els TLR han estat identificats com a PRR i s'ha determinat que juguen un paper crucial a la resposta immune enfront de patògens d'origen víric, bacterià o fúngic, induint la secreció de diverses citoquines proinflamatòries així com molècules coestimuladores de la superfície cel.lular, a través de l'activació de factors de transcripció com el NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*).

Els TLRs són proteïnes transmembrana que contenen LRRs extracel.lulars responsables del reconeixement dels PAMPs. Els TLRs regulen la senyalització a través d'un domini citosòlic conservat anomenat TIR (*Toll/Interleukin-1 receptor*) que juga un paper clau a la transducció de senyals mitjançant la interacció amb factors citosòlics. Aquesta resposta immune iniciada pels TLRs estimula la fagocitosi,

mitjançant la secreció de citocines proinflamatòries (p.e.  $\text{TNF}\alpha$  o  $\text{IL-1}\beta$ ), i promou la resposta immune adquirida mitjançant la inducció de molècules coestimuladores a la superfície de les cèl·lules T (p.e. ICAM-1). Aquests processos estan regulats mitjançant l'activació de diverses quinases i factors transcripcionals com  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , AP-1, Elk-1 i IRFs (Akira and Takeda, 2004). A mamífers igualment s'expressen proteïnes citosòliques amb dominis LRR. Algunes d'aquestes proteïnes LRR citosòliques pertanyen a la família NOD, i actuen com a PRRs per induir les vies de senyalització que condueixen a una resposta transcripcional enfront de la infecció bacteriana. Addicionalment s'ha descrit el seu paper en l'activació de les caspases i de l'apoptosi.



**Figura 11.** Vies de senyalització de Nod1, Nod2 i TLR4. Nod1 i Nod2 estan involucrades al mecanisme de reconeixement de derivats del peptidoglicà bacterià, el que resulta en el reclutament de quinases, que inclouen RICK/RIP2/RIPK2/CARDIAK, a través d'interaccions CARD-CARD. Una vegada que RICK és reclutada per Nod1 i Nod2, pot activar vies transcripcionals ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , AP-1, i Elk-1) i caspases. El TLR-4 complexat amb MD2 és essencial per al reconeixement del lipopolisacàrid (LPS) a la superfície cel·lular, resultant en el reclutament de varis factors, que inclouen els adaptadors que contenen dominis TIR, com MyD88, MAL/TIRAP/TICAM-1. A continuació es formen diversos complexos de quinases (IRAKs, TBK1/IKKi/TSK i RIP) que conduiran a la fosforilació de IKKs, MAPKs i IRF-3. Aquesta senyalització condueix a la producció de citocines proinflamatòries i diferents molècules de la superfície cel·lular (Inohara, 2005).

### 3.2. Família de proteïnes NOD.

L'Apaf-1 pertany a la família de proteïnes NOD que comprèn un grup creixent amb uns 20 membres identificats, que es caracteritzen per la presència d'un domini

conservat d'oligomerització i unió a nucleòtids. Nod1 i Nod2 van ser els primers membres d'aquesta família que es van identificar per estudis d'homologia amb Apaf-1. Vàries proteïnes de la família NOD han estat implicades en l'activació de NF- $\kappa$ B així com a l'activació de caspases. Així, es va comprovar com la sobreexpressió de Nod1 i Nod2 a cèl.lules de mamífer activava la mort cel.lular induïda per caspasa-9 i, sorprenentment induïa l'activació de NF- $\kappa$ B (Inohara, 2001). Nod1 i Nod2 participen al reconeixement específic de material bacterià. En concret, actuen com a receptors citosòlics del lipolisacàrid (LPS), producte de les bactèries Gram-negatives (Inohara, 2001; Ogura, 2001b). Altres proteïnes que presenten un domini central de tipus NOD són CIITA (*MHCII transactivator*), NAIP (*Neural apoptosis inhibitory protein*), Ipaf o la recentment reportada Criopirina (Agostini, 2004; Geddes, 2001; Roy, 1995; Steimle, 1993). Mutacions als gens que codifiquen per les proteïnes NOD humanes Nod2, criopirina i CIITA, i Naip5 a ratolins, estan associades amb malalties inflamatòries que disminueixen o augmenten la sensibilitat a les infeccions bacterianes (Inohara, 2003, 2005).

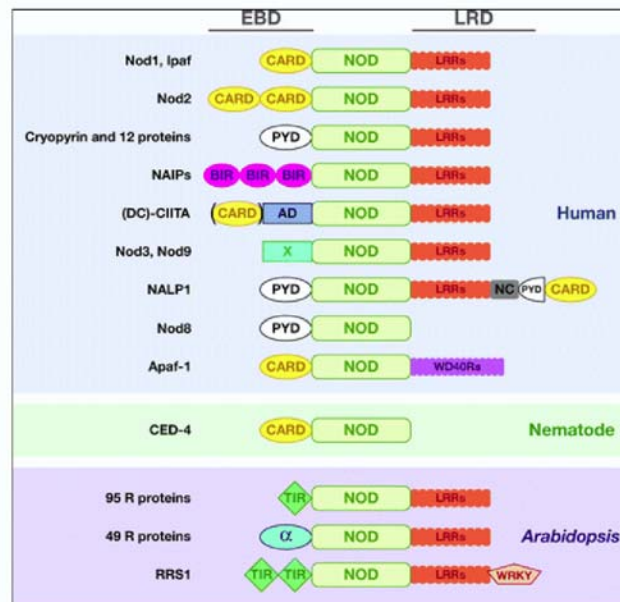
Tot i que el paper d'Apaf-1 a l'apoptosi està bé establert, els mecanismes pels que altres proteïnes NOD (p.e. Nod1, Nod2, Defcap, Ipaf o criopirina) regulen l'apoptosi no està clar. Algunes d'elles, com Nod1, IPAF o criopirina, indueixen l'activació tant de NF- $\kappa$ B com de caspasa-1. Així, en condicions fisiològiques, l'activitat proapoptòtica induïda a través d'algunes de les proteïnes NOD, podria estar regulada per la inducció simultània de l'activitat del NF- $\kappa$ B. A excepció de Nod1 i Nod2, que detecten components bacterians, els lligands, de tipus PAMPs, reconeguts per altres proteïnes NOD, que indueixen la seva oligomerització i el reclutament d'altres factors desencadenant la resposta immunitària, no han estat encara identificats.

### **3.3. Estructura de les proteïnes NOD.**

Els membres de la família NOD contenen tres dominis funcionals (Figura 12). Un domini *N*-terminal d'unió a efectors (EBD, *Efactor Binding Domain*), un domini central NOD i un domini *C*-terminal de reconeixement de lligands (LRD, *Ligand Recognition Domain*). El domini NOD és el responsable de l'autooligomerització, necessària per a l'activació posterior de les molècules efectores. El domini EBD de les NOD de mamífer és el responsable de la unió de les molècules efectores, el que determina els esdeveniments activats posteriorment a la senyalització, que inclouen l'apoptosi i l'activació de NF- $\kappa$ B. Aquests EBDs són estructuralment variables, i inclouen els dominis d'unió a caspases (CARD) i el PYD (*Pyrin Domain*). Amb



l'excepció d'Apaf-1, la major part de proteïnes NOD conegudes contenen LRDs C-terminals de tipus LRR (Inohara, 2003). Aquestes proteïnes NOD-LRR, també anomenades CATERPILLER (*CARD, transcripcion enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats*), s'expressen majoritàriament a cèl·lules dels sistema immune, tot i que l'expressió d'algunes, com Nod1, és ubíqua (Inohara, 2005).



**Figura 12.** Dominis estructurals de les proteïnes NOD (Inohara, 2005).

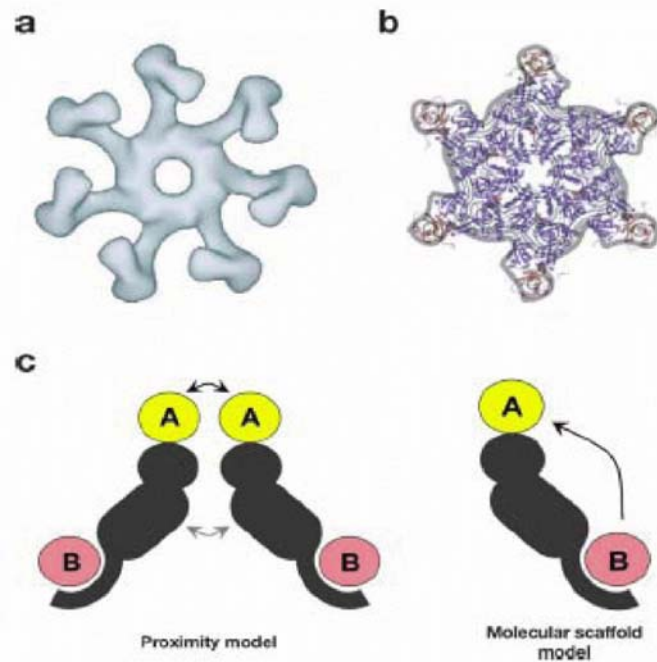
En el cas de Nod1 i Nod2, els seus LRD reconeixen productes bacterians i se sap que, com el WDR d'Apaf-1, actuen com a reguladors negatius. En aquests sentit, mutants de Nod1 i Nod2 en que s'ha eliminat els LRR, tenen incrementada la seva capacitat d'activar NF- $\kappa$ B. A més del domini NOD, que és el que permet l'autooligomerització, el domini EBD de les proteïnes NOD, incloent Apaf-1, Ced-4, Nod1, Nod2, Ipaf i la criopirina, té un paper clau en la unió d'aquestes proteïnes a les molècules efectores. Així, el CARD d'Apaf-1 s'uneix al CARD de la PC-9 mentre que el CARD de Nod1 i Nod2 s'ha demostrat que s'uneix al CARD de RICK mitjançant interaccions homofílques CARD-CARD (Inohara, 1999; Ogura, 2001b). L'homologia estructural entre Apaf-1 i les proteïnes NOD-LRR, fa pensar que aquestes proteïnes han de seguir mecanismes d'activació i senyalització similars. La regió N-terminal del domini NOD conté motius d'unió típics de NTPases (*Nucleoside triphosphatases*) de tipus ABC (*ATP-binding domains*) que inclouen motius d'unió de fosfat (*Walker A box*) i de magnesi (*Walker B box*). La mutació de residus conservats d'aquests motius a Nod1 i Nod2, impedeix la senyalització, el que indica que la hidròlisi dels nucleòtids és

essencial per a l'activació de la proteïna. Igualment, la regió ABC de les proteïnes NOD-LRR està molt relacionada amb el mòdul d'oligomerització que es troba a la família d'ATPases AAA+, que típicament formen complexos oligomèrics amb simetria de 6 o 7 eixos, molt similars al complex observat per a l'Apaf-1 (Acehan, 2002; Yu, 2005).

### **3.4. Regulació de les proteïnes NOD.**

Igual que l'oligomerització d'Apaf-1 induïx l'activació de la PC-9, hi ha evidències que l'activació del NF- $\kappa$ B induïda per Nod1 i Nod2 ha d'estar relacionada amb la proximitat induïda dels efectors, incloent RICK i el complex inhibidor de la quinasa NF- $\kappa$ B, IKK (Figures 11 i 13). Nod1 i Nod2 s'associen amb la quinasa RICK (RIPK2/RIP2/CARDIAK) a través d'una interacció homofílica CARD-CARD, induint l'activació del NF- $\kappa$ B (Inohara, 1999; Ogura, 2001b). El NF- $\kappa$ B activat es transloca al nucli, on s'unirà als promotors dels seus gens diana, activant la seva transcripció, que inclou la secreció de citoquines proinflamàtòries (Hayden, 2004). El paper de l'oligomerització en l'activació del NF- $\kappa$ B ha estat demostrat per l'observació que l'oligomerització forçada de subunitats de RICK o IKK condueix a l'activació del NF- $\kappa$ B. En aquest sentit, s'ha determinat que l'oligomerització de Nod1 induïx la proximitat de RICK (Inohara, 2000). Igualment s'ha observat que l'oligomerització forçada dels dominis efectors de Nod1, Nod2, criopirina o Ipaf induïx el procés de senyalització (Inohara, 2000; Ogura, 2001b).

Un model alternatiu al de proximitat induïda, seria un model anomenat de *scaffold* (Figura 13). En aquest cas la proteïna NOD-LRR reclutaria les molècules activadores, el que permetria la posterior activació de les molècules efectores unides al seu domini EBD. Tot i que varies proteïnes NOD comparteixin el mateix domini efector, per exemple CARD o PYD, poden activar diferents cascades de senyalització ja que la interacció entre aquests dominis i els presents als factors posteriors, és molt específica. Així, l'expressió transitòria de Nod1 i Nod2 a cèl·lules de mamífer induïx l'activació de NF- $\kappa$ B, mentre que aquesta activitat no s'ha observat per a l'Apaf-1, indicant que Nod1 o Nod2 i Apaf-1 activen diferents vies. Anàlisis mutagènics han posat de manifest que els CARDS i NODs de Nod1 i Nod2 són requerits per a la inducció de NF- $\kappa$ B, mentre que els LRRs són dispensables.



**Figura 13.** Estructura de les proteïnes NOD i models d'activació proposats. (a) Estructura de l'Apaf-1 oligomeritzada. (b) Model del complex format per la proteïna de la família AAA+ p97, unida al seu cofactor p47. (c) Dos models d'activació de les proteïnes NOD. Al model de proximitat induïda, els lligands estimuladors (B) són reconeguts pel domini LRD de la proteïna NOD, el que indueix la seva oligomerització via el seu domini central NOD (senyalat per fletxes gris clar) i el reclutament de les molècules efectores (A) via el seu domini EBD, el que indueix la seva proximitat (fletxes negres) i activació. Al model alternatiu d'*scaffold* molecular, la proteïna NOD recluta l'activador o activadors (B) el que permet activar (fletxa negra) les molècules senyalitzadores (A) (Inohara, 2005).

Nod1 i Nod2 reconeixen el LPS i el peptidoglicà (PGN) bacterians a través dels seus LRRs. Estudis recents han posat de manifest que el dipèptid derivat del peptidoglicà MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP, Muramil dipèptid) és l'estructura essencial bacteriana reconeguda per Nod2 (Inohara, 2003). D'altra banda, Nod1 reconeix molècules derivades del PGN que contenen l'àcid meso-diaminopimèlic (meso-DAP). A les bactèries, el meso-DAP i el MDP es generen com a intermediaris de la biosíntesi del PGN. A l'hoste, el liozím talla les cadenes de PGN i genera petits fragments anomenats muropeptids que contenen meso-DAP i MDP. Tot i que es coneix que els dominis LRR de Nod1 i Nod2 és on té lloc el reconeixement d'aquestes molècules, no s'ha pogut determinar si aquests lligands s'uneixen directament als LRRs o requereixen de cofactors per a la unió i l'activació. La unió del lligand als LRRs hauria de conduir a senyals que provocarien l'activació del domini NOD. En aquest sentit, l'anàlisi de diferents mutants ha posat de manifest l'existència d'interaccions funcionals entre aminoàcids localitzats a regions proximals dels LRRs i

la regió distal del domini NOD. Aquesta regió C-terminal del domini NOD, anomenada “*switching region*” s’ha proposat que juga un paper clau al pas d’una proteïna NOD inactiva cap a la seva forma activa, donat que mutacions puntuals o de deleció en residus d’aquesta regió condueixen a formes constitutivament actives de les proteïnes NOD-LRR (Tanabe, 2004). Aquestes observacions suggereixen un model al qual, interaccions intramoleculares entre la regió proximal dels LRRs i la distal del domini NOD, mediaríen una regulació negativa. Com a conseqüència de l’exposició als lligands microbians, hi hauria un canvi conformacional que conduiria a l’activació de la proteïna NOD. El paper d’aquests residus al reconeixement del MDP no està clar. Podrien participar a interaccions intramoleculares entre domini NOD i LRR. Alternativament interaccionarien directament amb MDP o bé indirectament a través de factors cel·lulars. Aquests resultats suggereixen que l’oligomerització de les proteïnes NOD seria probablement un mecanisme conservat per a l’activació d’aquesta família de proteïnes. En aquest sentit, l’oligomerització artificial de Nod1 o Nod2 s’ha mostrat suficient per l’activació de la via de senyalització NF- $\kappa$ B (Inohara, 2000; Ogura, 2001b).

### **3.5. Proteïnes NOD associades a malalties.**

Les alteracions en la capacitat de formació de l’apoptosoma han estat associades amb malalties humanes. Així, s’ha demostrat la manca d’expressió d’Apaf-1 a melanomes malignes (Fujimoto, 2004; Soengas, 2001). També s’ha descrit la pèrdua al·lèlica de la regió que conté el locus d’Apaf-1 a l’adenocarcinoma pancreàtic ductal, a glioblastoma (Watanabe, 2003) i leucèmia (Jia, 2001). Igualment s’han observat mutacions que alteren la pauta de lectura del gen Apaf-1 a càncer gastrointestinal (Yamamoto, 2000). Les alteracions en la regulació transcripcional i post-transcripcional d’Apaf-1 s’han associat amb altres tipus de càncer.

D’altra banda, variacions genètiques d’altres proteïnes NOD han estat relacionades amb malalties d’origen genètic. Mutacions a CIITA causen Type II Bare Lymphocyte Syndrome (BLS), una immunodeficiència hereditària que es caracteritza per la manca d’expressió de molècules MHC de classe II, essencials per a la presentació dels antígens a les cèl·lules T i la defensa de l’hoste enfront de patògens. La majoria de pacients amb BLS, pateixen immunodeficiències severes i moren a curta edat a causa d’infeccions. Mutacions a Nod2 i a CIAS1, el gen que codifica per la criopirina, han estat relacionades amb diverses malalties autoinflamatòries. Mutacions de Nod2 que resulten en proteïnes sense capacitat per induir l’activació de NF- $\kappa$ B en resposta a

peptidoglicà o MDP estan relacionades amb la malaltia de Crohn. Altres mutacions a Nod2 han estat relacionades amb la síndrome de Blau, una malaltia que es caracteritza per artritis i erupcions cutànies. El fet que mutacions a Nod2 provoquin malalties diferents s'explica per la diferent localització d'aquelles. Mentre que les responsables de la malaltia de Crohn es troben als LRRs o regions properes, les que provoquen la síndrome de Blau estan situades al domini NOD. Així, les Nod2 presents als pacients amb aquesta malaltia serien constitutivament actives, induint un increment de l'activitat basal de NF- $\kappa$ B. Les causants de la malaltia de Crohn, al contrari mantindrien els nivells d'activitat, però haurien perdut la capacitat de respondre als components bacterians. Aquesta dificultat per detectar les infeccions bacterianes ha de provocar una activació basal de NF- $\kappa$ B per altres vies secundàries, que causarien la inflamació intestinal.

Les aproximacions terapèutiques que consideren com a dianes a proteïnes NOD són nombroses. Estudis dirigits a restaurar els nivells d'Apaf-1 a diverses línies tumorals han correlacionat amb una pèrdua de la quimioresistència a aquestes línies. La sobreexpressió del domini CARD de l'Apaf-1 mitjançant la utilització de vectors virals, provoca la inhibició de l'apoptosi *in vivo* induïda per neurotoxines a un model de Parkinson, pel que s'ha proposat emprar aquest domini com a estratègia antiapoptòtica mitocondrial (Mochizuki, 2003). Igualment s'han desenvolupat recentment moduladors artificials de l'apoptosoma. Així, Lademann i col. han mostrat com una família de diarilurees actuen com a inhibidors de la formació de l'apoptosoma de 700 KDa dependent de Cit c, inhibint l'activació de la caspasa-9 (Lademann, 2003). Altres compostos identificats mitjançant el cribratge de quimiotèques indueixen l'oligomerització de l'Apaf-1 i la formació de l'apoptosoma, promovent l'activació de les caspases dependent de Cit c de forma selectiva a línies de cèl.lules tumorals (Nguyen, 2003). Recentment s'ha reportat la identificació de compostos capaços d'inhibir el reclutament de la PC-9 per l'apoptosoma mitjançant el cribratge d'una quimoteca de N-alkilglicines (Malet, 2006), així com l'efectivitat de la taurina per evitar l'apoptosi induïda per a la isquèmia miocàrdica, mitjançant la seva capacitat per impedir la interacció entre l'Apaf-1 i la caspasa-9, i l'ensamblatge de l'apoptosoma (Takatani, 2004). Altres estratègies tenen com a dianes a reguladors de l'apoptosoma, donat que s'han associat processos tumorals a alteracions de l'expressió de proteïnes que regulen la formació i activitat d'aquest. En aquest sentit, alts nivells d'expressió de XIAP s'associen amb leucèmia mieloide (Tamm, 2003). Aproximacions amb oligonucleòtids antisentit dirigits contra XIAP i Survivina estan actualment a

fase clínica per al tractament del càncer. Per contra, el suministrament mitjançant adenovirus de XIAP o NAIP s'ha provat per al tractament de la isquèmia cerebral, que està associada amb un increment de l'apoptosi (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005). Igualment, a l'actualitat s'estan desenvolupant aproximacions basades en l'utilització de pèptids derivats de Smac o compostos mimètics, per inhibir les IAPs i restaurar així l'activitat de les caspases (Tamm, 2003; Yang, 2003; Henderson, 2005).

## II. OBJECTIUS





D'acord amb els antecedents presentats a la Introducció General respecte el mecanisme de formació de l'apoptosoma i, en concret, en quant a la interacció entre el citocrom c i l'Apaf-1, dintre del context d'una línia de recerca iniciada a la Unitat de Química Bioorgànica (Departament de Química Orgànica Biològica, Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona, C.S.I.C.) relacionada amb el descobriment de noves molècules d'interès terapèutic, es proposà dur a terme un estudi sobre el complex Apaf-1 - Cit c que proporcionés informació útil per al disseny i desenvolupament de reguladors d'apoptosi. Cal esmentar que en el marc d'aquesta línia de recerca, el nostre grup havia iniciat recentment una col·laboració amb el grup del Dr. E. Pérez Payá (Laboratori de Pèptids i Proteïnes, *Centro de Investigación Príncipe Felipe*, València), al qual s'havia començat la posta a punt de tècniques per a la expressió recombinant d'Apaf-1. Al nostre laboratori es duria a terme l'obtenció de variants de citocrom c de llevat i de pèptids dissenyats per dotar-los de capacitat per interaccionar amb Apaf-1, amb l'objectiu de determinar les característiques estructurals necessàries que s'han d'incloure en molècules orgàniques perquè puguin actuar com a moduladors de l'apoptosoma. Així mateix es pretenia explorar l'obtenció eficient de construccions derivades d'Apaf-1 que es poguessin utilitzar com a alternativa als assaigs de reconstitució *in vitro* de l'apoptosoma, per dur a terme assaigs de cribratge.

Adicionalment, amb motiu d'una estada de 6 mesos al laboratori del Professor Gabriel Núñez (Departament de Patologia, *University of Michigan Medical School*, Ann Arbor, EUA) i dins el marc del programa d'investigació que es desenvolupa a aquest laboratori, dirigit a la caracterització de les vies de senyalització involucrades a l'apoptosi i la immunitat innata, es va plantejar com a objectiu addicional dur a terme estudis sobre la interacció entre el component bacterià muramil dipèptid i Nod2, que contribueixin a definir el mecanisme d'acció de Nod2.

Els objectius concrets plantejats van ser els següents:

- Estudis sobre la interacció entre citocrom c i Apaf-1:
  - Obtenció i caracterització de mutants de YCit c que incorporin modificacions a la regió N-terminal que aproximïn la seva seqüència a la dels citocroms de mamífers, i avaluació de la seva capacitat per interaccionar amb Apaf-1 i modular l'activació de caspases.

- Obtenció i caracterització de pèptids derivats dels mutants anteriors que mantindrien unit covalentment el grup prostètic del citocrom, i avaluació de la seva capacitat per interaccionar amb Apaf-1 i modular l'activació de caspases.
  - Obtenció i anàlisi funcional de construccions derivades d'Apaf-1-XL, que haurien de comprendre d'una banda els dominis CARD-NOD/CED-4 i d'altra el domini WDR, emprant un sistema procariota d'expressió.
- Estudis sobre la interacció entre muramil dipèptid i Nod2:
- Identificació bioquímica dels components del complex de reconeixement del MDP, responsable de l'activació de Nod2 en resposta a la presència del lligand derivat del peptidoglicà bacterià.
  - Determinació de la localització subcel.lular del MDP.

### III. MATERIALS i MÈTODES



## 1. PROCEDIMENTS GENERALS.

### 1.1. Equipament i instrumentació.

Termociclació:	Mastercycler Personal (Eppendorff) o bé Tgradient (Biometra).
Electroforesi:	Font PowerPac 300 amb cubetes SubCellGT (ADN) o MiniProtean 3 (SDS-PAGE) (BioRad).
Western blot:	Semidry Transfer Cell Transblot SD (BioRad) per les transferències, i M35X-0MAT Processor (Kodak), pel revelat per autoradiografia.
Electroporació:	<i>E. coli</i> Pulser (BioRad).
Incubadors:	Agitador orbital Novotron TR-225 (Infors-HT) o C25 <i>Incubator Shaker</i> (New Brunswick Scientific), pels cultius d' <i>E.coli</i> . Isotemp (Fisher Scientific), pels cultius de cèl.lules eucariotes.
Centrífugues i microcentrífuga:	Beckman J2-HS i TJ-6, i Eppendorff 5415D.
Disruptor cel.lular:	Basic Z Cell Disrupter (Constant System Ltd.).
Liofilitzador:	Freezone Plus 6 (LABCONCO).
Sistema de purificació d'aigua:	Arius 611 (Sartorius).
Cromatografia de FPLC:	ÄKTAprime proveït de columnes HiTrapChelating, HiTrapHP, HiTrapQHP, HiTrapSPHP, Superdex200 10/40, i HiTrapBenzamidineFF (Amersham Biosciences). ÄKTA, constituït per una vàlvula INV-907, una bomba P-920, un detector UPC-900 acoblat un collector de fraccions Frac-900, provist de columna Superdex200 16/60 (Amersham Biosciences).
Cromatografia d'HPLC:	Sistema Waters constituït per un detector PAD996, controlador 600S Controller, bomba 626Pump, i software de control/adquisició Millennium v. 2.15 (Waters), amb columnes Symmetry 300-C <sub>18</sub> (25 x 0,46 cm, Waters) o Kromasil 100-C <sub>18</sub> (25 x 0,46 cm o 25 x 1 cm, Teknokroma).
Espectrofotòmetres:	Cary300 amb termostatitzador Cary PCB150 (Varian), i SPECTRAMax PLUS Microplate Spectrophotometer (Molecular Devices).

Espectrofluorímetres:	Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (SLM-AMINCO), i LS50B Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer). Cubetes de quars de 3 mL i 1 cm de camí òptic, i semimicro de 45 µL i 0.3 cm de camí òptic (Hellma), per a les mesures de polarització de fluorescència. 1420 <i>Multilabel HTS Counter</i> VICTOR <sup>2</sup> V (Wallac) per a mesures en plaques de 96 pous.
Dicroïsmes Circulars:	Jasco J-720 proveït d'un bany de termostatització i cubeta circular de quars, de 2,5 mL i 10 mm de camí òptic (Hellma).
Espectrometria de masses:	
MALDI-TOF:	VOYAGER-DE-RP (Applied Biosystems).
HPLC-ESI-MS:	Sistema Hewlett Packard Series 1100 LC/MSD o bé un sistema constituït per un cromatògraf de líquids Waters 2690 acoblat a un detector de matriu de diodes Waters 996 i un espectròmetre de masses Micromass Quattro LC-Mass.
<sup>1</sup> H-RMN:	Varian Unity 300 (299,949 MHz per a <sup>1</sup> H-RMN).
Microscòpia de fluorescència:	Olympus BX-51 o bé Olympus Fluowiew Confocal Scanning Microscope, per a microscòpia confocal.

## 1.2. Reactius.

Els reactius comercials emprats van ser de qualitat per a anàlisi i van ser adquirits a Sigma-Aldrich, Merck KGaA o Fisher Scientific. Les solucions aquoses es van preparar emprant aigua ultrapura miliQ (resistivitat  $\geq 18\text{M}\Omega$ ).

## 1.3. Procediments d'esterilització.

En general, els medis de cultiu i dissolucions es van esterilitzar en autoclau durant 20 min. a 120 °C. Com a procediment alternatiu per a la esterilització de solucions sensibles a la temperatura (ampicil·lina i d'altres antibiòtics, IPTG,...) es va utilitzar l'esterilització per filtració a través de filtres de 0,22 µm Millex-GS (Millipore).

## 1.4. Cultius bacterians.

### 1.4.1. Soques d'*E. coli*.

Les soques d'*E. coli* JM109 i Sure (Stratagene) es van emprar en les preparacions d'ADN plasmídic de les construccions de YCit c i Apaf-1. La soca Stbl2 (Invitrogen) es va emprar per a la clonació i preparacions d'ADN plasmídic de les construccions derivades d'Apaf-1. Les soques d'*E. coli* HB2151 (Amersham Biosciences) i BL21(DE3) (Invitrogen) es van emprar per dur a terme l'expressió de les construccions derivades de YCit c, les primeres, i de YCit c i d'Apaf-1 les segones. La soca DH5 $\alpha$  (Invitrogen) es va emprar per a la clonació i expressió de les construccions derivades de Nod2.

### 1.4.2. Medis de cultiu.

La triptona i l'extracte de llevat emprats provenien de Pronadisa. En general, el pH dels medis s'ajustà per addició de NaOH 5 M, prèviament a l'esterilització en autoclau. Per a la preparació dels medis selectius (LBamp, TBamp), als medis estèrils s'hi afegí 1 mL/L d'una solució estèril d'ampicil.lina (100 mg/mL). Els cultius es van dur a terme amb agitació orbital (200-250 rpm, medi líquid) o en estufa (cultius en placa) a una temperatura, si no s'especifica el contrari, de 37 °C. Alternativament, per a la preparació dels medis LB i LBamp, es van emprar LB-Medium Capsules (25 càpsules/L, Q-Biogen).

Composició per litre dels medis de cultiu:

LB: 10 g triptona, 5 g extracte de llevat, 10 g NaCl. S'ajusta a pH 7,0. Per medi sòlid, s'afegeix 15 g d'agar abans d'esterilitzar.

TB: 12 g triptona, 24 g extracte de llevat, 4 mL glicerol, 2,35 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 9,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

NZY+: 10 g amina NZ (hidrolitzat de caseïna), 5 g extracte de llevat, 5 g NaCl. S'ajusta a pH 7,5 i es complementa amb 12,5 mL MgCl<sub>2</sub> 1 M, 12,5 mL MgSO<sub>4</sub> 1 M, 10 mL glucosa 2 M (solucions esterilitzades per filtració).

SOB: 20 g triptona, 5 g extracte de llevat. S'ajusta a pH 7,0 i es complementa amb 2,5 mL KCl 1 M, 10 mL MgCl<sub>2</sub> 1 M, 10 mL MgSO<sub>4</sub> 1 M, 2 mL NaCl 5 M (solucions esterilitzades per filtració).

SOC: S'afegeixen 9 mL de glucosa 40 % estèril per L de medi SOB.

## 1.5. Mètodes de biologia molecular.

### 1.5.1. Plasmidis i vectors.

El plasmidi pBPCYC1(wt)/3 va ser facilitat pel laboratori del Dr. A. G. Mauk (Universitat de British Columbia, Vancouver, Canadà) (Pollock, 1998). En aquesta construcció es coexpressen el gen de YCit c (CYC1), en el qual s'ha substituït la Cys102 per Thr per tal d'evitar la dimerització per formació de ponts disulfur i l'autoreducció del ferricitocrom, i el gen de l'enzim citocrom c hemoliasa (CYC3), que promou la unió covalent del grup hemo als residus de Cys14 i Cys17 del citocrom (Figura 14).

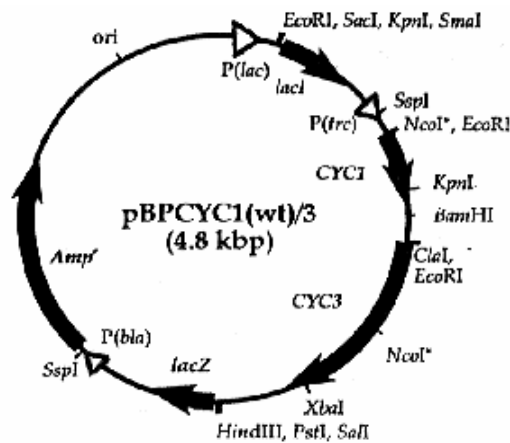


Figura 14. Estructura del plasmidi pBPCYC1(wt)/3 (Pollock, 1998).

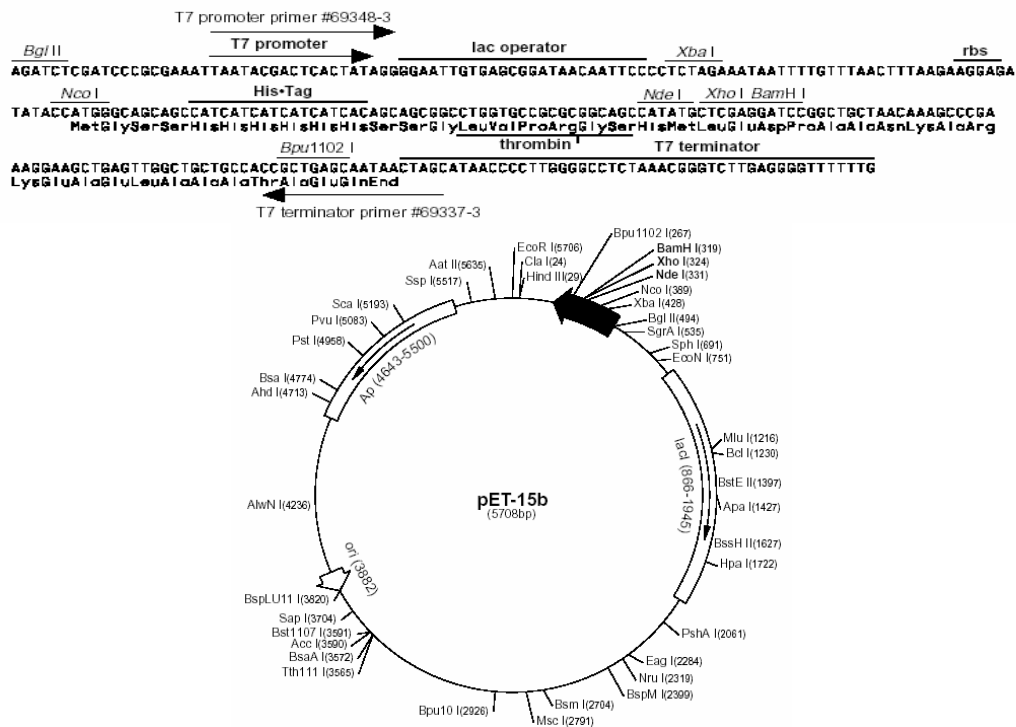
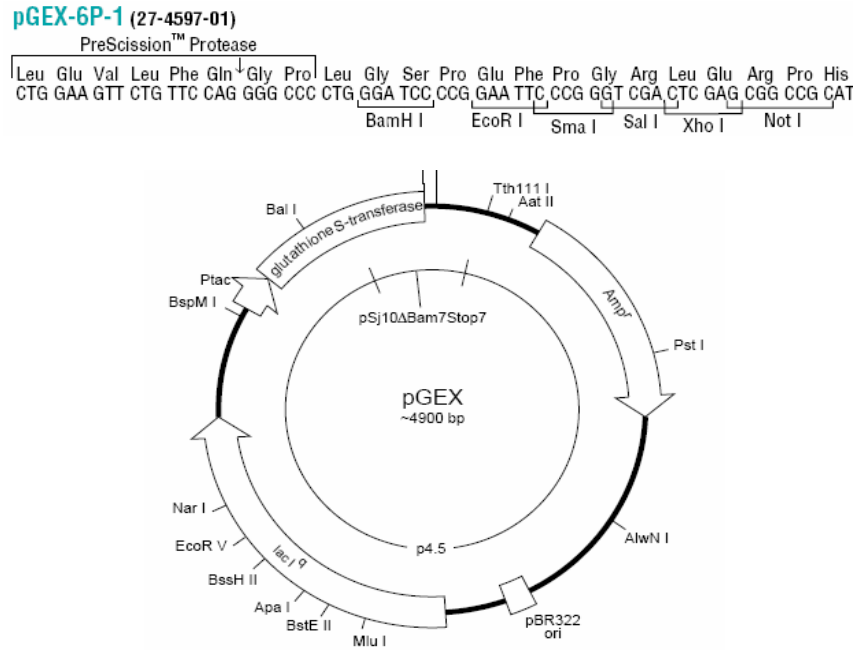


Figura 15. Vector pET15b (Invitrogen). Detall de la seqüència de la regió de clonació.





**Figura 16.** Estructura general dels vectors de la família pGEX, (Amersham Biosciences). Detall de la seqüència del lloc de clonació per als vectors pGEX-6P1.

Els vectors pET15b (Figura 15) i pGEX-6P1 (Figura 16), emprats per a l'obtenció de les construccions derivades d'Apaf-1, van ser subministrats per Novagen (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanya) i Amersham Biosciences (Uppsala, Suècia) respectivament. La construcció d'Apaf-1-XL, pDNA3(Apaf) (Hu, 1999), va ser facilitada pel laboratori del Dr. Enrique Pérez Payà, (Centro de Investigación Príncipe Felipe, València). Les construccions derivades d'Apaf-1-XL i subclonades a pGEX-4T1 (Figura 16), pGEX4(CARD/CED4) i pGEX4(WD40R), van ser facilitades pel Dr. Àngel G. Martín (National Cancer Institut, Frederick, EUA).

### 1.5.2. Preparació i transformació de cèl.lules d'*E. coli* competents.

#### - *Protocol de Hanahan.*

En general al llarg de tot el treball es va utilitzar el mètode de Hanahan (Hanahan, 1983) per a la preparació de cèl.lules supercompetents. Es partia d'un cultiu (O/N, 30 °C) de la soca d'*E. coli* corresponent en 5 mL de medi SOB. 0,5 mL d'aquest s'utilitzaven per inocular un subcultiu de 200 mL de SOB disposats en un erlenmeyer d'1 L, els quals s'incubaven a la mateixa temperatura fins arribar a una  $OD_{550} = 0,5$ . Després de recollir les cèl.lules per centrifugació, es resuspenien en 20 mL de tampó TFB (10 mM MES pH 6,2, 100 mM RbCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM (NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>CoCl<sub>3</sub>) a 4 °C i s'incubaven en gel durant 15 min. S'hi afegien 700 µL de DMSO agitant suaument i es mantenien en gel durant 10 min. Seguidament, s'afegien 700

$\mu\text{L}$  més de DMSO i després d'incubar en gel durant 5 min addicionals, es feien alíquotes de 0,5 mL en tubs d'1,5 mL, les quals s'emmagatzemaven a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La transformació d'aquestes cèl.lules supercompetents es realitzava per xoc tèrmic. Alíquotes (100  $\mu\text{L}$ ) prèviament descongelades i mantingudes a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s'incubaven amb l'ADN plasmídic desitjat en un bany de gel durant 15 min. A continuació es duia a terme el xoc tèrmic incubant a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant 5 min i posteriorment en un bany de gel durant 2 min. S'hi afegien 800  $\mu\text{L}$  de medi SOC i el cultiu es sembrava en plaques de LBamp sòlid, que s'incubaven durant un mínim de 16 h. Aquest protocol es va modificar en alguns casos, d'acord amb les recomanacions que apareixen a la documentació proveïda pels *kits* o productes comercials emprats.

*- Protocol d'electroporació.*

Per a la preparació de cèl.lules electrocompetents una alíquota d'1 mL d'un cultiu (3 mL, O/N) en LB s'utilitzava per iniciar un subcultiu (100 mL) en el mateix medi. Aquest es deixava créixer fins  $\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$  i es recuperaven les cèl.lules per centrifugació. El pèllet cel.lular es resuspenia en 100 mL d'aigua miliQ estèril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , es centrifugava i es repetia el rentat amb 50 mL i 5 mL d'aigua miliQ estèril a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalment les cèl.lules es resuspenien en 2 mL de glicerol aquós (10%) estèril i es feien alíquotes de 50  $\mu\text{L}$ , que es guardaven a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El procediment emprat per dur a terme les electroporacions consistia en descongelar les alíquotes anteriors i afegir-hi 1-2  $\mu\text{L}$  de l'ADN plasmídic desitjat, dissolt en un tampó de baixa força iònica, TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), o aigua. La barreja s'incubava durant 1 min i es transferia a una cubeta d'electroporació de 0,1 cm (BioRad) freda. A continuació s'aplicava un pols de voltatge (25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$ , 1,65 kV) i immediatament les cèl.lules es resuspenien en 900  $\mu\text{L}$  de medi SOC, s'incubava durant 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i tot el volum s'emprava per realitzar un cultiu en una placa de LBamp.

### **1.5.3. Preparació d'ADN plasmídic.**

En general, totes les preparacions d'ADN plasmídic es van realitzar a partir de cultius d'*E.coli* JM109 transformats amb el plasmidi corresponent. El procediment consistia en seleccionar colònies de la placa de transformants per iniciar cultius (3 mL) en medi LBamp. Aquests cultius s'incubaven durant unes 6 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i a continuació s'empraven 0,5 mL per inocular un subcultiu de 50 mL del mateix medi, que es deixava créixer O/N en les mateixes condicions. Les cèl.lules es recol·lectaven per centrifugació i es resuspenien en 2,5 mL de TEG (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10

mM, Glucosa 50 mM). S'hi afegien 5 mL d'una dissolució 0,2 M NaOH-1 % SDS i després d'agitar-ho, es deixava 5 min en gel. A continuació es s'afegien 2,75 mL d'una dissolució 6,2 M de NH<sub>4</sub>OAc pH 5,6 i es deixava 10 min en gel. Al sobrenedant resultant de la centrifugació de la solució anterior, s'hi afegien 6,9 mL d'alcohol isopropílic i es deixava reposar durant 10 min a Tamb. El precipitat recuperat per centrifugació d'aquesta solució, es rentava dues vegades amb EtOH 70 % fred. Un cop assecat, es redissolia en 1,2 mL de TE estèril i es traspassava a un tub Eppendorf d'1,5 mL. A continuació s'incubava amb 10 µL de RNAsa (RNase - DNase *free*, 500 µg/mL, Boehringer Mannheim) a 37 °C durant 1 h. Posteriorment l'ADN exempt d'ARN es purificava per extracció amb fenol:cloroform. La concentració d'ADN plasmídic es determinava espectrofotomètricament a partir del valor de l'Abs a 260 nm ( $Abs_{260} = 1$  correspon a una concentració 50 µg/mL de dADN).

#### 1.5.4. Reaccions de modificació de l'ADN.

##### - *Digestions amb enzims de restricció.*

Els enzims de restricció es van adquirir a les empreses Fermentas, New England Biolabs, Stratagene o d'altres similars. Es preparaven barreges de reacció que generalment contenien 1 U/µg d'ADN dels enzims adients en cada cas, en el tampó de reacció recomanat, i es deixava reaccionar típicament durant 4-6 h a 37 °C. Quan es requeria dur a terme digestions dobles de forma seqüencial, es procedia a fer una primera digestió O/N a 37 °C amb l'enzim menys eficient, i a continuació s'hi addicionava el segon enzim, que es deixava reaccionar durant 4-6 h a 37 °C. A continuació, es confirmava que la digestió havia estat complerta analitzant una alíquota del cru de reacció per electroforesi en gels d'agarosa a l'1 %.

##### - *Reaccions de desfosforilació.*

Típicament, als crus de digestió dels vectors s'hi addicionava 1 U de fosfatasa alcalina (1 U/µL, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Fermentas) i el volum necessari del corresponent tampó de reacció (10x). Es deixava reaccionar durant 30 min a 37 °C i s'inactivava l'enzim per tractament tèrmic a 85 °C durant 30 min.

##### - *Reaccions de lligació.*

Per a les reaccions de lligació es van emprar lligases T4 de Fermentas, New England Biolabs, Promega o d'altres similars, seguint en cada cas el protocol descrit pel fabricant corresponent. Transcorregut el temps de reacció, generalment O/N a 16 °C, s'extreien alíquotes d'1 i 9 µL del cru de reacció, amb les que es transformaven alíquotes de 50-100 µL de cèl.lules competents.

- *Mutagènesi dirigida.*

La preparació de mutants es va dur a terme emprant el *QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), basat en la utilització de l'ADN polimerasa termoestable *PfuTurbo* i de parelles d'oligonucleòtids mutagènics complementaris com a encebadors de les reaccions de termociclació. Es van seguir totes les recomanacions dels protocols inclosos en el *kit* amb petites modificacions. Les barreges de reacció es preparaven emprant els components i condicions proveïts en el *kit*, per tal d'assegurar-ne la correcta utilització. Seguidament s'hi afegia 1 µL de *PfuTurbo* (2,5 U/µL, Stratagene). Es feien reaccions amb 5 ng, 20 ng i 50 ng de dADN motlle. En paral·lel es feien reaccions de control, on no s'hi afegia l'ADN motlle. Els paràmetres de la reacció de termociclació per a l'obtenció dels mutants van ser els indicats pel fabricant, tot i que es van haver d'ajustar temps i les temperatures corresponents a l'etapa d'elongació, en funció de la llargada del fragment a amplificar, i de la T<sub>m</sub> de l'oligonucleòtid emprat en cada cas, que es va calcular segons la fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

el terme *% mismatch* no es té en compte en el cas de mutants de deleció. Per tal de seleccionar els ADN mutants, els crús de les reaccions es tractaven amb 1 µL de Dpn I (10 U/µL, Stratagene) durant 1 h a 37 °C. Aquesta endonucleasa és específica per a ADN metilat i hemimetilat i permetia eliminar de forma selectiva el dADN motlle emprat. La introducció de les mutacions desitjades es va confirmar per seqüenciació de l'ADN obtingut en fer les corresponents preparacions plasmídiques.

En alguns casos aquest protocol es va variar emprant parelles d'encebadors mutagènics que no eren complementaris, i que mitjançant una reacció de PCR emprant *Pfu* com a polimerasa, donaven lloc a l'amplificació dels fragments linealitzats que contenien les mutacions desitjades.

#### 1.5.5. Electroforesi d'ADN.

S'empraren gels d'agarosa (*Ultra Pure DNA Grade Agarose*, BioRad) a l'1-1.5 %, preparats amb tampó TAE (Tris - AcOH 40 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM), els quals contenien 0,5 µg/mL de bromur d'etidi (Sigma). En cada cas, es preparava una mostra addicional amb un marcador de pes molecular (*Gene Ruler™ Ladder Mix*, 0,5 mg/mL, Fermentas). Les electroforesis es desenvolupaven en TAE a un voltatge constant de 120 V aproximadament durant 1 h, fent servir com a referència el front de blau de bromofenol.

- *Purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa.*

Per a la recuperació de l'ADN dels gels d'agarosa es va emprar el *QIAEX<sup>®</sup> II gel extraction kit* (Qiagen) seguint les recomanacions del fabricant, amb petites modificacions. La concentració final d'ADN es determinava espectrofotomètricament. Quan va ser necessari, l'ADN així purificat es precipitava afegint 2,75 volums d'una solució 10 M d'acetat amònic en EtOH (1:10 v/v) a -20°C. El precipitat recuperat per centrifugació es rentava dues vegades amb etanol 70 % fred, es deixava assecar a l'aire o amb un buit lleuger, i es redissolia en 20 µL d'aigua mili-Q o tampó TE estèrils.

### 1.5.6. Seqüenciació d'ADN.

Es va realitzar al Servei de Seqüenciació de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB - CSIC) i al DNA Sequencing Core (University of Michigan, Ann Arbor, EUA).

## 1.6. Anàlisi de proteïnes.

### 1.6.1. Electroforesi en gels d'acrilamida SDS-PAGE.

Es van emprar gels de poliacrilamida amb SDS preparats segons el procediment descrit per Laemmli (Laemmli, 1970). A les mostres de proteïna (~25 µL) se'ls hi addicionava un volum de tampó de càrrega (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (p/v) SDS, 0.025 % (p/v) blau de bromofenol, 200 mM DTT i 20 % (v/v) glicerol) i s'escalfaven a 95 °C durant 2 min. L'electroforesi es desenvolupava en tampó Tris-Gly (25 mM Tris, 192 mM Gly, 1 % (w/v) SDS) a un voltatge de 120 V, emprant com a referència el front de blau de bromofenol. Els gels es revelaven per tinció amb blau de Coomassie (Ausubel, 1995) o per tinció amb plata. Alíquotes del marcadors de pes molecular *Broad Range SDS-Page Standard* (Bio-Rad), *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen) o *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen) es van emprar quan va ser necessari.

### 1.6.2. Tinció amb plata.

Es va seguir el protocol descrit per Blum i col. (Blum, 1987). En primer lloc es procedia a fixar el gel SDS-PAGE durant 45 min- 1 h, emprant una solució 25 % EtOH, 10 % AcOH glacial. A continuació, el gel es rentava amb una solució al 50 % EtOH (20 min, 3 cops) i es feia un tractament d'1 min amb una solució 0,02 % (p/v) de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Es rentava amb aigua miliQ (20 s, 3 cops) i s'impregnava durant 20 min amb una dissolució 0,2 % (p/v) d'AgNO<sub>3</sub>. El gel es rentava de nou amb aigua miliQ (20 s, 2

cops) i es desenvolupava per incubació durant 1-10 min amb la dissolució de revelat (6 % (p/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05 % (v/v) de solució de formaldehid al 37 %, 0,004 % (p/v) de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, en aigua). La reacció de tinció s'aturava per addició d'una solució 25 % EtOH, 10 % AcOH. Finalment el gel es rentava amb aigua miliQ (10 min, dos cops) i a continuació amb una solució 5 % MeOH, 3 % glicerol durant 20 min.

### **1.6.3. Western-blot.**

Per les anàlisis per *Western-blot*, les proteïnes prèviament separades per electroforesi s'electrotransferien a una membrana de nitrocel·lulosa (*Millipore Immobilon-P*, Millipore) aplicant un corrent fix de 0,3 A durant 110 min (tampó de transferència: Tris-HCl 50 mM, Glicina 40 mM, SDS 0,1 % (p/v), metanol 20 % (v/v)). La membrana es bloquejava mitjançant una incubació de 30 min a Tamb amb una dissolució al 0,5 % de llet en pols desnatada en tampó TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,0005% IGE-PAL630 (Sigma), pH 7,6. S'incubava durant 1 h a Tamb o bé O/N a 4 °C amb l'Ab primari desitjat en cada cas, típicament diluït 1:10.000 en una dissolució 5 % de llet en pols desnatada en tampó TBS-T. Llavors, la membrana es sotmetia a tres rentats de 20 min amb TBS-T, i a continuació s'incubava durant 1 h a Tamb amb una dissolució en TBS-T + 0,5 % (v/v) de llet, de l'Ab secundari adient conjugat a peroxidasa (BioRad), fent típicament una dilució 1:10.000. Finalment, es feien tres rentats de 20 min amb TBS-T, i es revelava per quimioluminiscència emprant els ECL™ *Western Blotting Analysis Detection Reagents* (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant.

### **1.6.4. Quantificació.**

La quantificació de les dissolucions de proteïna es va dur a terme mitjançant un assaig colorimètric emprant el *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad). Com a patró es feien servir dissolucions de BSA de concentració coneguda.

## **2. PRODUCCIÓ DE MUTANTS DE YCIT c.**

### **2.1. Mutagènesi dirigida.**

Es van generar els mutants desitjats seguint el protocol descrit a l'apartat 1.5.4. Es van emprar parelles d'oligonucleòtids complementaris com a encebadors mutagènics, que donaven lloc directament als plasmidis mutants. Les seqüències d'aquests

oligonucleòtids es detallen a la Taula 2 i els dADN emprats com a motlle i els plasmidis mutants que resultaren, a la Taula 3.

**Taula 2.** Seqüència dels oligonucleòtids emprats com a encebadors per a l'obtenció de les construccions derivades de YCit c. Es representa només la seqüència d'un dels dos encebadors complementaris emprats en cada reacció de mutagènesi. En negreta es destaquen les mutacions introduïdes en cada cas.

Nom dels encebadors	seqüència	T <sub>m</sub> (°C)
prCYC(Δ)	5'-CACACAGGAAACAGACCATG_GGTTCTGCTAAGAAAGGTGC-3' (deleció 15 bp)	85
prCYC(K27M)	5'-GGAAAAGGGTGGCCACATATGGTTGGTCCAAACTTGC-3'	77
prCYC(A7K)	5'-GGGTTCTGCTAAGAAAGGTAAGACACTTTTCAAGACTAG-3'	73
prCYC(P25K/K27M)	5'-GGAAAAGGGTGGCAAACATATGGTTGGTCC-3'	70

**Taula 3.** ADN motlle i encebadors emprats en la generació dels plasmidis mutants.

motlle	encebadors	dADN generat
pBPCYC1(wt)/3	prCYC(Δ)	pCYC1(Δ)/3
pBPCYC1(wt)/3	prCYC(K27M)	pCYC1(K27M)/3
pCYC1(Δ)/3	prCYC(K27M)	pCYC1(Δ/K27M)/3
pCYC1(Δ/K27M)/3	prCYC(A7K)	pCYC1(Δ/A7K/K27M)/3
pCYC1(Δ/K27M)/3	prCYC(P25K/K27M)	pCYC1(Δ/P25K/K27M)/3
pCYC1(Δ/P25K/K27M)/3	prCYC(A7K)	pCYC1(Δ/A7K/P25K/K27M)/3

## 2.2. Expressió dels mutants.

Per a la producció dels mutants de YCit c es van fer cultius en les soques d'*E.coli* HB2151 i BL21(DE3) transformades amb els corresponents plasmidis mutagènics, pCYC(K27M), pCYC1(Δ/A7K/K27M)/3, pCYC1(Δ/P25K/K27M)/3, i pCYC1(Δ/A7K/P25K/ K27M)/3, seguint el protocol descrit per a l'expressió de YCit c (Pollock, 1998). Es partia d'una colònia transformada amb el plasmidi corresponent per iniciar un cultiu en 3 mL de medi LBamp. Després d'incubar (37 °C, 250 rpm) durant 6 h, s'empraven 0,5 mL d'aquest cultiu per iniciar un subcultiu en 50 mL de medi TBamp, el qual s'incubava en les mateixes condicions durant 3 h. En una preparació típica, 6 erlenmeyers de 2 L que contenien 1,5 L de medi TBamp s'inoculaven cadascun amb 5 mL del subcultiu anterior i s'incubaven (37 °C, 220 rpm) durant 36-48 h, abans de recollir les cèl·lules per centrifugació. D'aquesta manera s'obtenien uns 30 g (pes humit) d'una pasta de cèl·lules, la qual presentava una coloració vermellosa prou evident com a conseqüència del citocrom c present. La pasta de cèl·lules es resuspensava en 75 mL de tampó de lisi (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM), i seguidament s'hi afegien 10 mg de lizozim (Sigma) dissolts en 5

mL d'aigua i s'incubava a 4 °C amb agitació suau durant 1 h, abans de congelar les suspensions. Els lisats de cèl·lules així obtinguts es guardaven a -80 °C fins el moment de processar-los.

### **2.3. Purificació dels citocroms c recombinants.**

Durant tota la manipulació es mantenia la dissolució de proteïna a 4 °C. Per tal de minimitzar la degradació proteolítica de les proteïnes, tots els tampons emprats durant el procés de purificació contenien PMSF 1 mM.

Als lisats obtinguts segons es descriu a l'apartat anterior, s'hi adicionaven 5 mL d'una dissolució 2 M de MgCl<sub>2</sub>, així com 5 mg de DNasa I (Sigma) i 3 mg de RNasa A (Sigma) dissolts en 2 mL d'aigua. Aquestes barreges s'incubaven a 4 °C amb agitació suau, durant 3 h, fins que presentaven una consistència fluïda. Seguidament les suspensions es centrifugaven per recollir el sobrenedant, de color rosat degut al Cit c en dissolució. Els precipitats resultants es resuspenien en tampó de lisi i es centrifugaven una altra vegada, repetint el procés fins a aconseguir la desaparició de la coloració rosada del precipitat. A continuació, als sobrenedants ajuntats se'ls hi afegia lentament sulfat amònic fins a una concentració de 320 g/L, mantenint agitació vigorosa i la temperatura a 4 °C. Un cop centrifugats de nou, els sobrenedants vermellosos es dialitzaven dues vegades durant 12 h i a 4 °C contra 5 L de tampó A (fosfat sòdic 20 mM, pH 7,0) emprant membranes de diàlisi de 12.000 Da de mida de porus (Sigma). Els dialitzats resultants es centrifugaven un cop més abans de carregar la dissolució en una columna de CM-Sefarosa CL-6B (Pharmacia), prèviament equilibrada amb tampó A. Després de rentar la columna amb 100 mL del tampó anterior, el citocrom s'elueïa mitjançant un gradient lineal de tampó A fins a tampó A + 0,5 M NaCl. Les fraccions que contenien el citocrom es concentraven per ultrafiltració (Ultrafree-15, 5.000 Da, Millipore), fins a un volum de uns 2 mL. Les dissolucions resultants, d'un color rosat intens, es tractaven amb unes gotes de dissolució saturada de NH<sub>4</sub>[Co(dipicolinat)<sub>2</sub>] en aigua, per tal de portar completament la proteïna a l'estat fèrric (Fe<sup>3+</sup>). L'excés d'oxidant i de sals s'eliminaven amb una columna de dessalat (Sephadex G-25, Pharmacia) eluint amb tampó A, i les fraccions recollides es concentraven de nou per ultrafiltració. Finalment, les fraccions concentrades es carregaven en un sistema de FPLC ÄKTAprime equipat amb una columna de bescanvi catiònic fort (HiTrap SP HP, Pharmacia) prèviament equilibrada amb tampó A i s'elueïen amb un gradient lineal fins a tampó A + 1 M NaCl. Les fraccions recollides es concentraven de nou i s'agrupaven segons la seva concentració i



factor de puresa ( $RZ = Abs_{409}/Abs_{280}$ ) els quals es determinaven espectrofotomètricament:  $\epsilon^{409} = 106 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i  $RZ = 4.78$  per a la forma oxidada (Margoliash, 1959). Les solucions de proteïna purificada es mantenen congelades a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  fins al moment de ser utilitzades (Pollock et al., 1998).

### 3. PRODUCCIÓ DE CONSTRUCCIONS DERIVADES D'APAF-1-XL

#### 3.1. Mutagènesi dirigida

Els oligonucleòtids emprats com a encebadors mutagènics es detallen a la Taula 4 i els *d*ADN emprats com a motlle a la Taula 5.

**Taula 4.** Seqüència dels oligonucleòtids emprats com a encebadors per a l'obtenció de les construccions derivades d'Apaf-1-XL. En negreta es destaquen les mutacions introduïdes i es subratllen i indiquen les dianes de restricció generades en cada cas. Els sufixes *se* i *ase* indiquen que l'oligonucleòtid correspon a la seqüència codificant (sentit) o a la complementaria (antisentit).

Noms dels encebadors	seqüències	T <sub>m</sub> (°C)
prApaf(Stop/X) <i>se</i>	5'-GTTTATCAGCAAGCTTAGCTCGAGGCCAAGCAGGAGG-3' XhoI	77
prApaf(N+4) <i>se</i>	5'-CCAACCTAGGCATATGGATGCAAAAGCTCG-3' NdeI	70
prApaf(Stop/B) <i>ase</i>	5'-GTCCTCTTCAGAAATGAGCGGATCCTATTATTCTAAAGTCTG-3' BamHI	74
prApaf(B) <i>se</i>	5'-CCAACCTGGATCCATGGATGCAAAAGCTCG-3' BamHI	71
prApaf(Stop/E) <i>ase</i>	5'-GCTGATAAACTTCTGAATTCCTCCTACTCACAGAGACCC-3' EcoRI	72

**Taula 5.** ADN motlle i encebadors emprats en les reaccions de mutagènesi dirigida per a l'obtenció dels diferents mutants d'Apaf-1-XL.

motlle	encebadors	mutant generat
pcDNA3(Apaf)	prApaf(Stop/X) *	pcDNA3(Apaf-X)
pcDNA3(Apaf-X)	prApaf(N+4) <i>se</i> prApaf(Stop/B) <i>ase</i>	ApafXL(N/X/B)2
pcDNA3(Apaf)	prApaf(B) <i>se</i> prApaf(Stop/E) <i>ase</i>	ApafXL(B/E)

\* Es va emprar la parella d'oligonucleòtids complementaris com a encebadors.

El plasmidi mutagènic pcDNA3(Apaf-X), que inclou un codó de *stop* i una diana de restricció XhoI entre les posicions 1741-1749 del gen d'Apaf-1-XL, va ser generat a

partir de la construcció pcDNA3(Apaf) emprant el procediment estàndard del *kit QuikChange* (apartat 1.5.4). El resultat de la mutagènesi es confirmà mitjançant digestió amb XhoI i electroforesi en un gel d'agarosa a l'1%, que va donar lloc a una banda de 9.7 Kb corresponent al plasmidi linealitzat, així com per seqüenciació de l'ADN. A partir de pcDNA3(Apaf-X), mitjançant una reacció de PCR (inici: 1 min a 95 °C; 30 cicles: 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 10 min a 66 °C; final: 10 min a 66 °C, llavors a 4 °C) emprant els oligonucleòtids mutagènics prApaf(N+4)*se* i prApaf(Stop/B)*ase* es va amplificar el fragment ApafXL(N/X/B)2. A continuació, es van fer digestions seqüencials, primer amb XhoI i després amb BamHI, tant del fragment ApafXL(N/X/B)2 com del vector pET15b, seguides de lligació del fragment XhoI-BamHI d'Apaf i del vector linealitzat. La posterior transformació de cèl.lules *MAX Efficiency Stbl2 Competent Cells* (Invitrogen) amb el cru de lligació, i aïllament del plasmidi amplificat va permetre obtenir la construcció pET(Apaf-WDR). La identitat d'aquesta es va confirmar per digestió amb les endonucleases XhoI i BamHI i anàlisi per electroforesi, que va donar lloc a dues bandes de 2,0 i 5,7 KB corresponents a la inserció i el vector, respectivament, així com per seqüenciació de l'ADN. Per contra, la mateixa estratègia emprant els enzims NdeI i XhoI per tal d'obtenir la construcció pET(Apaf-CARD-NOD/CED4) no va donar resultats satisfactoris.

Per aquest motiu, es va modificar la estratègia de clonatge, de manera que, a partir de pcDNA3(Apaf) i mitjançant una reacció de PCR (inici: 1 min a 95 °C; 30 cicles: 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 10 min a 68 °C; final: 10 min a 68 °C, llavors a 4 °C) emprant els oligonucleòtids mutagènics prApaf(B)*se* i prApaf(Stop/E)*ase*, es va amplificar el fragment ApafXL(B/E), que presenta una diana BamHI just abans del codó d'inici del gen d'Apaf-1-XL i un codó de *stop* i una diana EcoRI entre les posicions 1711-1721 de l'esmentat gen. A continuació es van fer dues digestions seqüencials amb EcoRI i BamHI del fragment anterior i del vector pGEX6P1, seguit d'una reacció de lligació entre el fragment BamHI-EcoRI i el vector pGEX6P1 linealitzat. De nou, la transformació de cèl.lules *Stbl2* i aïllament del corresponent plasmidi va donar lloc a la construcció pGEX6(Apaf-CARD-NOD/CED4). La identitat d'aquesta es va confirmar per digestió amb EcoRI i BamHI i anàlisi per electroforesi, el qual va donar dues bandes de 1,7 i 4,9 Kb corresponents a la inserció i el vector, respectivament, així com per seqüenciació de l'ADN.

### 3.2. Expressió de les construccions derivades d'Apaf-1-XL.

El procediment general fou similar a l'emprat per a l'expressió dels mutants de YCit c. Es feien cultius (5 mL) en LBamp a partir d'una colònia d'*E.coli* BL21(DE3) transformada amb el corresponent plasmidi mutagènic. Després d'incubar durant 3 h a 37 °C, 50 µL d'aquest cultiu s'utilitzaven per inocular 50 mL del mateix medi, que es s'incubaven O/N en les mateixes condicions. En una preparació típica, de 2 a 6 erlenmeyers de 2 L que contenien 0,5 L de medi LBamp, s'inoculaven cadascun amb 0,5 mL del subcultiu anterior i s'incubaven a 37 °C durant el temps necessari per arribar a una OD<sub>600</sub> entre 0,4-0,6, típicament 3-4 h. En aquest moment s'hi addicionava el volum necessari d'una dissolució 100 mM d'IPTG (*dioxane-free*, Calbiochem) estèril per arribar a la concentració final desitjada. Després de 2 h d'incubació a 37 °C, es recollien les cèl.lules per centrifugació. En experiments realitzats per analitzar els efectes sobre la expressió de canvis en la temperatura durant la inducció, els cultius es deixaven créixer a 37 °C fins a OD<sub>600</sub> = 0.4, i llavors es portaven a la temperatura desitjada i es deixaven continuar creixent fins OD<sub>600</sub> = 0.7 abans d'afegir l'inductor. El període d'inducció s'estenia durant 2-3 h, passades les quals les cèl.lules es recuperaven per centrifugació i es resuspenien en uns 50 mL de tampó de lisi (en general, 20 mM Tris-HCl pH 7,5 + 1 mM PMSF, o 20 mM fosfat sòdic pH 7,4 + 100 mM NaCl + 1 mM PMSF) abans de sotmetre-les a disrupció per pressurització a 1.9 Kbar i despressurització.

### 3.3. Purificació de la construcció Apaf-1-XL(582-1248).

El lisat cel.lular obtingut segons es descriu a l'apartat anterior es centrifugava obtenint-se un sobrenedant, o fracció soluble, i un pèl.let, o fracció insoluble. Un cop s'havia comprovat que la proteïna d'interès es trobava a la fracció insoluble en forma de cossos d'inclusió, en primer lloc aquesta fracció es rentava 3 vegades amb tampó Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. A continuació, el pèl.let es resuspenia en el tampó de solubilització adient, que contenia 1 % Tritó-X100, 5 mM DTT i 6 M d'urea, s'incubava durant 2-3 h en un bany de gel i es centrifugava, separant-se un sobrenedant i un pèl.let, que s'analitzaven per electroforesi SDS-PAGE. Quan va ser necessari, la proteïna solubilitzada es va preparar per a la purificació posterior mitjançant una diàlisi contra 5 L de tampó B (20 mM fosfat sòdic pH 7,4 + 0,5 M NaCl + 6 M urea + 5 mM DTT) durant 12 h i a 4 °C.

Les purificacions es van realitzar emprant una columna *HisTrapHP* de 5 mL acoblada a un aparell de FPLC ÄKTAprime (Amersham Biosciences) seguint el

protocol descrit al *His-bind purification kit* (Amersham Biosciences). Al llarg de la purificació es treballava a un flux de 5 mL/min. En primer lloc s'equilibrava la columna amb 25 mL de tampó B + 5 mM imidazole. Es carregava la mostra i rentava amb 25 mL més del mateix tampó i després amb 50 mL de tampó B + 20 mM imidazole. Finalment la mostra s'el·luïa amb 25 mL de tampó B + 700 mM imidazole. Es van recollir fraccions d'1 mL al llarg de les diverses etapes de la purificació, monitoritzant l'Abs<sup>280</sup>, de forma que les fraccions que presentaven absorció a aquesta longitud d'ona, s'analitzaren per electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE. Finalment s'ajuntaren totes les fraccions que contenien la proteïna d'interès i es van sotmetre a diàlisi contra tampó PBS (20 mM fosfat sòdic pH 7,4 + 100 mM NaCl), en una o múltiples etapes. La solució de proteïna es concentrà per ultrafiltració emprant filtres Ultrafree-15 o Centricon YM-10 (Millipore).

#### **3.4. Construccions clonades a pGEX6P1 i pGEX4T1: Apaf-1-XL(1-570), Apaf-1-XL(1-572) i Apaf-1-XL(570-1248).**

Es va seguir el protocol descrit al manual *GST Gene Fusion System* (Amersham Biosciences) amb certes modificacions. Als lisats cel·lulars obtinguts segons es descriu a l'apartat 3.2, s'hi addicionava 1 mM DTT i 1% Tritó-X100, i s'incubava amb agitació suau durant 1 h a 4 °C. El sobrenedant separat per centrifugació, s'incubava amb 1 mL d'una suspensió de glutatió-sefarosa (*Glutathione Sepharose 4B* 50 %, Amersham Biosciences) durant 3 h a 4 °C, mantenint agitació suau. La suspensió es centrifugava (500 xg, 5 min, 4 °C) i la resina es rentava primer amb 5 mL de PBS i després amb 5 mL de tampó d'escissió (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM), per a la construcció derivada de pGEX-6P1, o bé 5 mL addicionals de PBS, per a les construccions derivades de pGEX4. A continuació, la resina s'incubava amb agitació suau durant 4 h a 4 °C amb 80 U de *PreScission protease* (2 U/μL, Amersham Biosciences), en el cas de la construcció derivada de pGEX-6P1, o durant 2 h a Tamb amb 40 U de Trombina (40 U/μL, Amersham Biosciences), en el cas de les derivades de pGEX-4T1. Es centrifugava i es recuperava el sobrenedant per centrifugació, i a continuació la resina es rentava amb 1 mL més de tampó. Després de centrifugar, les solucions de proteïna provinents de pGEX-6B1 es van analitzar per electroforesi i es van guardar a -80 °C fins el moment de la seva utilització. En el cas de les construccions que provenien de pGEX-4T1, per tal d'eliminar les restes de trombina, els sobrenedants de l'etapa anterior es van passar a través d'una columna HiTrapBenzamidineFF (Amersham Biosciences) d'1 mL, eluint amb tampó 50 mM

Tris-HCl, 50 mM NaCl pH 7,4. Les solucions resultants es van analitzar per electroforesi i es van guardar a -80 °C fins a ser utilitzades.

#### 4. OBTENCIÓ DE DERIVATS DE CITOCROM C.

##### 4.1. Obtenció de hemopèptids derivats de citocrom c per reacció amb BrCN.

Les mostres de proteïna (1,5 mM) es van dissoldre en àcid fòrmic o àcid trifluoracètic (TFA) al 70 %, i es van tractar amb un excés de BrCN (relació molar 1:100) a temperatura ambient, sota atmosfera de N<sub>2</sub> i en absència de llum. La reacció s'aturà per dilució amb 10 volums d'aigua (Corradin, 1970; Gross, 1967; Bryant, 1984). Es va fer un seguiment de les reaccions per HPLC emprant com a fase mòbil barreges d'aigua (eluent A) i acetonitril (ACN, eluent B) que contenen un 0,1 % de TFA. Es va utilitzar el programa de gradients que s'indica a la Taula 6 (A), treballant sempre a un flux d'1 mL/ min. La purificació dels hemopèptids, es va dur a terme mitjançant HPLC a escala semipreparativa utilitzant els mateixos eluents, emprant el programa de gradients descrit a la Taula 6 (B) i treballant a un flux de 3 mL /min.

**Taula 6.** Programes de gradients emprats per al seguiment per HPLC de les reaccions de degradació amb BrCN dels citocroms (A) i la purificació dels pèptids resultants (B).

(A)	Temps (mins)	%A	%B
	0	71	29
	35	40	60
	45	71	29

(B)	Temps (min)	%A	%B
	0	75	25
	30	70	30
	35	40	60
	45	75	25
	50	75	25

##### 4.2. Preparació de Zn-citocrom

Es va seguir el protocol descrit per Vanderkooi i col. (Vanderkooi, 1975, 1976) amb petites modificacions. Així, 25,6 mg (~2 µmol) de HHCit c (Sigma), es van introduir en un vial de 20 mL de polipropilè i es van posar sota atmosfera d'argó. Es va refredar a

-80 °C i s'hi van addicionar a poc a poc 5 mL de HF-Piridina (70 % HF) (Acros) emprant una xeringa de polipropilè i una cànula de tefló. El citocrom es va dissoldre i es va mantenir en agitació durant 30 min a -80 °C. A continuació, el cru de reacció es va extreure del vial amb una xeringa de polipropilè emprant una cànula de tefló i es va abocar gota a gota sobre 30 mL de NaOH 5 N a 0 °C. Finalitzada l'addició, es va mantenir l'agitació durant 2 h a 0 °C. El cru es va diluir amb 50 mL de tampó fosfat 50 mM pH 7,0 i es va sotmetre a 3 diàlisis consecutives contra 5 L de tampó fosfat 50 mM pH 7,0 a 4 °C, i posteriorment a 3 més contra aigua mili-Q a 4 °C. D'aquesta manera s'obtingué el porfirin-citocrom, en el que s'havia eliminat el catió metàl·lic del grup hemo, del qual es van enregistrar els espectres d'absorció electrònica i de fluorescència (Vanderkooi, 1975). Durant tot el procés es va evitar el contacte amb la llum del derivat HHCit c - porfirina.

Per tal d'introduir el catió  $Zn^{2+}$  en el grup prostètic del derivat anterior, la solució de HHCit c - porfirina es va concentrar i es va acidificar per addició d'AcOH glacial fins a pH 2,5. A continuació s'hi van addicionar 10 equivalents de  $ZnCl_2$  i la barreja de reacció es va mantenir amb agitació a 50 °C, monitoritzant els canvis en l'espectre d'absorció electrònica d'alíquotes del cru de reacció extretes cada 30 min. Un cop finalitzada la reacció, es va bescanviar el medi àcid per tampó Hepes 20 mM, pH 7,4, per ultrafiltració amb un filtre Ultrafree -15 (Millipore) i es van enregistrar els espectres d'absorció electrònica i de fluorescència de la dissolució final, de la que es va determinar la concentració a partir de l'absorbància a 423 nm ( $\epsilon^{423}=243 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Vanderkooi, 1975). Es van fer alíquotes i es va conservar a -20 °C evitant en tot moment el contacte amb la llum.

## 5. CARACTERITZACIÓ BIOFÍSICA DELS MUTANTS I CONSTRUCCIONS DERIVADES DE CITOCROM I APAF-1.

### 5.1. Espectrometria de masses.

Mostres de les proteïnes purificades i exemptes de sals es van analitzar per ESI-MS emprant barreges d'aigua - acetonitril amb 0,1 % de TFA, a un flux d'1 mL/min, com a fase mòbil per als citocroms i derivats dels mateixos, i barreges aigua - metanol (50:50), a un flux 0,2 mL/min, com a fase mòbil per a les construccions derivades d'Apaf-1. Les mostres es van injectar en modalitat FIA dissoltes a concentracions de ~1 mg/mL. Alternativament les mostres es van analitzar per espectrometria MALDI-

TOF emprant àcid sinapínic (Aldrich) o àcid  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinàmic (Aldrich) com a matriu.

## 5.2. Dicroïsmo circular.

Els espectres de dicroïsmo circular (DC) es van enregistrar a partir de solucions de proteïna o hemopèptid ( $\sim 4 \mu\text{M}$ ) en tampó 20 mM fosfat de sodi pH 7,0. Els valors d'el·lipticitat enregistrats es van transformar en el·lipticitats molars ( $[\theta]$ ,  $\text{mdeg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) emprant la fórmula

$$[\theta] = \theta \cdot 100 / c \cdot l$$

on  $\theta$  correspon als valors d'el·lipticitat enregistrats (mdeg),  $c$  a la concentració (M) de la dissolució de pèptid o proteïna i  $l$  al camí òptic de la cubeta emprada per realitzar les mesures (cm). L'estabilitat tèrmica dels citocroms es va estudiar a partir dels canvis d'el·lipticitat a 220 nm en sotmetre les mostres a un gradient tèrmic d'1,5 °C/min. El valor de la temperatura de desnaturalització ( $T_m$ ) es va determinar a partir de la primera derivada de les corbes de fusió (Hildebrand, 1994). Per als hemopèptids derivats del YCit c, s'hi van addicionar percentatges creixents, fins al 90 %, de trifluoroetanol (TFE) (Sakamoto, 1997).

## 5.3. Espectroscòpia d'absorció electrònica.

Els espectres d'absorció electrònica dels citocroms es van enregistrar entre 250 i 700 nm amb dissolucions de concentracions  $\sim 10 \mu\text{M}$  en tampó 100 mM fosfat pH 7,0. Els experiments de dependència amb el pH es van realitzar ajustant el pH de les dissolucions amb NaOH 0,1-1 M o HCl 0,1-1 M. Els espectres es van enregistrar a 25 °C i en un marge de pH entre 2 i 12 (Pollock, 1998). Per determinar el nombre d'ionitzacions produïdes en el marge de pH estudiat i el nombre de possibles espècies presents en dissolució, es va utilitzar una expressió derivada de l'equació de Henderson-Hasselbach (Lloyd, 1996) (Equació 1) per a múltiples ionitzacions que s'ajustés convenientment als valors experimentals obtinguts (Equació 2).

$$\text{Àcid} \leftrightarrow \text{base} + \text{H}^+ \quad \text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{base}]}{[\text{àcid}]} \right)$$

**Equació 1.** Expressió de *Henderson-Hasselbach* per a la ionització d'un àcid monopròtic.

$$Z = \frac{(D + X_3 \cdot [C + X_2 \cdot (B + X_1 \cdot A)])}{(1 + X_3 \cdot [1 + X_2 \cdot (1 + X_1)])}$$

**Equació 2.**  $Z$  és l'absorbància;  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $D$ ,  $\text{pK}_1$ ,  $\text{pK}_2$  i  $\text{pK}_3$  són paràmetres a determinar, i

$$X_1 = 10^{(\text{pK}_1 - \text{pH})}, X_2 = 10^{(\text{pK}_2 - \text{pH})}, X_3 = 10^{(\text{pK}_3 - \text{pH})}$$

Per determinar el coeficient d'extinció molar de l'hemopèptid derivat de la degradació del mutant YCitc ( $\Delta_{5\rightarrow 1}/A7K/P25K/K27M$ ) es va emprar el mètode de l'hemocrom (Antonini, 1964). A una dissolució de l'hemopèptid en tampó fosfat de sodi 20 mM pH 7,0, que te  $Abs_{500-600nm} = 0,3-0,9$  s'hi afegeixen 3 volums d'una dissolució de piridina - NaOH - aigua (10:3:30), i uns cristalls de ditionit sòdic abans d'enregistrar l'espectre entre 450 nm-600 nm. A partir del valor d' $Abs^{551}$  i tenint en compte que  $\epsilon^{551} = 29,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  per a l'hemo c, es va calcular la concentració de la dissolució. Coneguda la concentració, a partir del valor de l'absorbància al màxim de la banda de Soret per a una dissolució de l'hemopèptid en tampó fosfat de sodi 20 mM pH 7,0, es va determinar el coeficient d'extinció molar.

#### 5.4. Espectrometria de fluorescència.

Els espectres de fluorescència es van enregistrar entre 300 i 700 nm per dissolucions de concentració  $\sim 10 \mu\text{M}$  en tampó 50 mM fosfat de sodi, pH 7,0. Per al HHCit c-porfirina,  $\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$ , mentre que per al Zn-HHCit c,  $\lambda_{exc} = 550 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em} = 640 \text{ nm}$ . Els espectres es van enregistrar a 25 °C.

#### 5.5. Ressonància magnètica nuclear.

Es van preparar solucions (0,5-1 mM) de cadascun dels citocroms recombinants en tampó fosfat de sodi 50 mM pH 7,0 en D<sub>2</sub>O (el pH no s'ha corregit pels efectes isotòpics i correspon a la lectura directa del pHmetre) per dur a terme l'anàlisi per <sup>1</sup>H-RMN (Pollock, 1998). En tots els casos es van fer servir les següents condicions d'adquisició: 10000 acumulacions, amb un temps d'adquisició de 125 ms i emprant finestres espectrals de 25657,5 Hz. En el tractament dels espectres es va emprar un filtre d'eixamplament de banda (lb) de 10 Hz. Tots els espectres es van referenciar respecte el senyal residual d'aigua, al qual es va assignar un desplaçament químic de 4,67 ppm.

## 6. CARACTERITZACIÓ DE LA INTERACCIÓ ENTRE APAF-1 I ELS MUTANTS I DERIVATS DE CITOCROM C.

### 6.1. Assaigs d'activació de procaspases.

Es van emprar els procediments posats a punt per G. Malet (Malet, 2004), M. Orzaez i L. Mondragon, del Centre de Investigació Príncepe Felipe (València), els quals es descriuen breument a continuació.



### 6.1.1. Reconstitució d'apoptosomes *in vitro* i activació de PC-9.

Es van emprar 100-200 ng Apaf-1-XL recombinant, 30 ng de HHCit c (Sigma), 3 µL de [<sup>35</sup>S-Met]-PC-9 transcrita i traduïda *in vitro*, en un volum total de 20 µL de tampó (Hepes-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1mM, PMSF 0,1 mM) suplementat amb dATP 0,1 mM i MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM. Simultàniament es van fer controls en presència o absència d'Apaf-1-XL, dATP o de HHCit c. L'activitat dels mutants de citocrom i dels hemopèptids derivats es va avaluar substituïnt el HHCit c per quantitats variables d'aquests. Les incubacions es van dur a terme a 30 °C durant 1 h i es van aturar per addició de 5 µL de tampó SDS (5x). A continuació es va avaluar el processament de la [<sup>35</sup>S-Met]-procaspasa-9 mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS 16 %. L'anàlisi per autoradiografia i quantificació de les bandes de PC-9 i p35, aquesta formada pel processament de la primera, permetia estimar l'activitat dels apoptosomes reconstituïts.

### 6.1.2. Assaigs de detecció dels processament de caspasa-3 *in vitro* emprant extractes lliures de cèl.lules.

Per a la quantificació de l'activitat caspasa-3 es va realitzar un assaig proteasa, amb extractes cel.lulars i el substrat fluorogènic de la caspasa-3 Ac-DEVD-afc (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina) (Biomol). Es van emprar fraccions citoplasmàtiques derivades d'extractes S-100 produïts a partir de cèl.lules HEK293 cultivades en monocapa. Així, es duia a terme un fraccionament d'aquests extractes per cromatografia de bescanvi iònic per tal d'obtenir una fracció anomenada FT (*flow through*) que contenia les caspases-9 i -3 i el Cit c, i una segona fracció, anomenada F1, que contenia l'Apaf-1. Aquests dos extractes no presentaven activitat caspasa per separat, però en combinar-los, es reconstituïa una activitat igual que per a l'extracte total S-100. A més, a partir de l'extracte FT, mitjançant la incubació amb SP-Sefarosa (Amersham Pharmacia), s'obtenien extractes buits de Cit c, anomenats FT-S.

Els assaigs d'activació de PC-3 als extractes lliures d'Apaf-1 (FT) es van dur a terme per complementació mitjançant l'addició d'Apaf-1-XL recombinant, o de les construccions *N*-terminal i *C*-terminal derivades d'aquesta, i dATP. Mostres que contenien 5 µL de l'extracte cel.lular FT, 1 mM dATP i 4 µM d'Apaf-1-XL, prèviament preincubada amb el corresponent citocrom o hemopèptid, a una concentració 15 µM d'aquests, a 30 °C durant 1 h, en un volum total de tampó de 5 µL (Hepes-KOH 20

mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaEDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 0,1 mM, PMSF 0,1 mM), es van incubar a 37 °C durant 60 min. Igualment, es van fer controls que es mantienien inactius a 0 °C. Seguidament, es determinava l'activitat caspasa-3 afegint 3 µL de les incubacions anteriors a 100 µL d'una solució del substrat fluorogènic Ac-DEVD-afc (20 µM) en el tampó d'assaig (PBS, glicerol 1 %, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM), disposada en plaques fosques de 96 pous Opti-plate (Perkin Elmer). La determinació de l'afc lliure es va dur a terme monitoritzant la variació de l'emissió de fluorescència a  $\lambda_{em} = 508$  nm, emprant excitació a  $\lambda_{exc} = 400$  nm. Es van enregistrar els valors promig corresponents a intervals de mesura contínua de 60 s, per triplicat, a 30 °C, emprant un fluorímetre lector de plaques.

## **6.2. Assaigs de polarització de fluorescència.**

### **6.2.1. Assaigs d'interacció entre Apaf-1-XL i ZnHHCit c.**

Es van seguir els protocols descrits per Purring i col. (Purring, 1999, 2000). Es van enregistrar les mesures de polarització de fluorescència a  $\lambda_{em} = 587$  nm amb  $\lambda_{exc} = 550$  nm. Les mesures es van dur a terme a ~25 °C i en tot moment es va mantenir la dissolució que contenia el Zn-HHCit c en absència de llum i la d'Apaf-1-XL, i les construccions que contenen el domini WDR, en un bany de gel. Així, sobre una dissolució ~10 µM de Zn-HHCit c en el tampó de l'assaig (20 mM Hepes pH 7,4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA), s'hi van fer successives addicions d'una dissolució d'Apaf-1-XL recombinant (facilitada pel Dr. Ángel G. Martín, Nacional Cancer Institute, Frederick, EUA), o el mutant de deleció corresponent, en el mateix tampó, fins que s'arribà a un excés molar d'entre 1.2 i 2 respecte el Zn-HHCit c. Per a cada addició es van fer 10 mesures de polarització de fluorescència durant un temps total de 5 min.

### **6.2.2. Assaigs de competència.**

Es van seguir els protocols descrits per Purring i col. (Purring, 1999, 2000). Sobre una alíquota de 50 µL d'una dissolució d'Apaf-1 – Zn-HHCit c en relació molar 1:2, preparada segons es descriu a l'apartat anterior, s'hi va addicionar el volum mínim d'una dissolució concentrada de HHCit c, o de cadascuna de les construccions derivades de YCit c, per arribar a excessos de 20:1 fins a 40:1 respecte el Zn-HHCit c present. Les dissolucions resultant es van incubar, durant 24 h, a Tamb i en absència de llum, monitoritzant les variacions en el valor de la polarització de la fluorescència al llarg del temps.

## 7. ESTUDIS SOBRE EL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE NOD2 EN RESPOSTA AL MURAMIL DIPÈPTID (MDP).

### 7.1 Mètodes generals.

#### 7.1.1 Soques cel.lulars.

Les soques de cèl.lules embrionàries de ronyó humanes HEK293 i HEK293T (*Human Embryonic Kidney*, Stratagene) es van emprar per a l'expressió de Nod2 i mutants derivats d'aquest, Nod1 i YopM. Les cèl.lules de macròfag preparades a partir de la medul.la òssia de ratolí (MBMM, *Mouse Bone Marrow Macrophages*) (Chamaillard, 2003) es van emprar per als estudis de localització subcel.lular.

#### 7.1.2 Cultius d'HEK293 i HEK293T.

Les cèl.lules de mamífer HEK293 i HEK293T es van fer créixer en cultius monocapa en plats de 150 mm (*Cell Culture plates*, Corning) en 25 mL de medi DMEM suplementat (DMEM+). Els cultius es van deixar créixer fins arribar a un 80 % de confluència. En aquest punt, les cèl.lules es van tripsinitzar i es van recollir en 10 mL de DMEM+. Es va emprar 1 mL d'aquesta suspensió per iniciar nous cultius en 25 mL de DMEM+. Els cultius es van fer créixer a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>.

DMEM+: 500 mL DMEM (Gibco), 10 % de FBS (sèrum boví fetal, Gibco) inactivat tèrmicament (56 °C 30min), 1 % (v/v) L-Glutamina (200 mM, Gibco), 1 % (v/v) de penicil.lina (5,000 U/mL, Gibco) i 1 % (v/v) d'estreptomicina (5,000 µg/mL, Gibco).

#### 7.1.3. Obtenció dels lisat cel.lulars.

Cultius de HEK293 o HEK293T realitzats com es descriu a l'apartat anterior crescuts fins a un 80 % de confluència aproximadament, es rentaren dos cops amb 5 mL de PBS i a continuació es recolliren en 10 mL de PBS. Es centrifugaren i es van resuspendre en el volum requerit del tampó de lisi desitjat en cada cas. La suspensió de cèl.lules resultant es va congelar amb N<sub>2</sub> líquid i un cop descongelades, es van sonicar (10 s, cinc vegades). Un cop lisades les cèl.lules, es van centrifugar recuperant-se el sobrenedant.

#### 7.1.4. Cultius de cèl.lules de macròfag.

Per a l'obtenció de les cèl.lules de macròfag preparades a partir de medul.la òssia de ratolí (MBMM, *Mouse Bone Marrow Macrophages*) es va seguir el protocol descrit per Chamaillard i col. (Chamaillard, 2003). L'extracció de cèl.lules de medul.la òssia

es va fer passant 30 mL de BMDM, que es recolliren en un plat de Petri de 150 mm. Les cèl·lules s'incubaven durant tres dies, es bescanviava el medi per 30 mL de BMDM fresc i s'incubaven dos dies més. El cinquè dia, es rentaven tres cops amb 5 mL de PBS i s'incubaven amb 20 mL de PD estèril (PD, 0,3 mM KCl, 0,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,137 mM NaCl, 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4) a 4 °C durant 10 min, i finalment es recollien les cèl·lules en 10 mL de DPBS (Dulbecco). Es centrifugava, i el pèl·let resultant es va resuspendre en 10 mL de BMDM. A continuació es procedia a contar les cèl·lules, i iniciar un cultiu en medi BMDM a la concentració desitjada.

**BMDM (*Bone Marrow Macrophage Differentiation Media*):** 500 mL medi Iscove's (Gibco), 10 % FBS inactivat tèrmicament (56 °C, 30 min), 150 mL de *L-cell conditioned media* (Kobayashi, 2002), 1 % (v/v) de L-Glutamina (200 mM, Gibco), 45 mL de β-mercaptoetanol (50 mM, Sigma), 1 % (v/v) de penicil·lina (5,000 U/mL, Gibco) i 1 % (v/v) d'estreptomicina (5,000 µg/mL, Gibco).

#### **7.1.5. Plasmidis i vectors.**

Per a l'obtenció de les construccions FLAG-Nod2-LRR i FLAG-Nod2L1007fs-LRR, es va emprar el vector pcDNA3-FLAG, preparat a partir del pcDNA3 (Invitrogen), i es va partir de les construccions pcDNA3(HA-Nod2) (Ogura, 2001b) per a l'obtenció del pcDNA3(FLAG-Nod2-LRR), i de pcDNA3(HA-Nod2L1007fs) (Ogura, 2001a), per a l'obtenció de la construcció pcDNA3(FLAG-Nod2L1007fs-LRR).

## **7.2. Assaigs de precipitació de HA-Nod2 amb MTP –biotina.**

### **7.2.1. Procediment general.**

A 1 mL del sobrenedant resultant de la lisi de cèl·lules HEK293T que expressaven HA-Nod2 (2 plats de Petri de 150 mm per experiment) s'hi van afegir 40 µL d'una dissolució 1 µg/mL de MTP-Biotina (Bachem) i es va incubar 30 min a 37 °C. Com a tampó de lisi es va emprar 2 mL de DBPS (Gibco) per experiment, que contenia un 0,2 % de CHAPS així com el tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A) (Chen, 2005) (50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Tritó-X-100, 0,1 % (v/v) glicerol, pH 7,4), als que s'hi adicionaven 1mM ATPγS (Sigma) i 10 µL de PIC (barreja d'inhibidors de proteases, Sigma) en el moment de la seva utilització. Com a control es va reservar 1 mL del sobrenedant del lisat cel·lular al que no s'hi va afegir MTP-biotina. A continuació, s'hi van adicionar 40 µL d'estreptavidina immobilitzada sobre agarosa CL-4B (1,025 g/mL, Fluka) a l'experiment així com al

control, i es van incubar a 4 °C durant 1 h mantenint agitació suau. L'agarosa es va recuperar per centrifugació i es va rentar sis cops amb 1 mL de DPBS que contenia 0,2 % de CHAPS. Finalment es van afegir 20 µL de tampó de càrrega i es van incubar a 100 °C durant 5 min. Les proteïnes es van separar per electroforesi SDS-PAGE en un gel al 7,5 % en acrilamida i es van detectar per *Western blot* emprant un anticòs (Ab) anti-HA (*HA-Probes Y11 Rabbit policlonal IgG*, 200 µg/mL, SantaCruz Biotechnologies) com a anticòs primari i un anti-Ab conjugat a peroxidasa (*Peroxidase-conjugated Goat anti-rabbit, Fc fragment specific*, 0,8 mg/mL, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) com Ab secundari.

### 7.2.2. Assaig de preconcentració per immunoprecipitació de HA-Nod2.

Es va seguir el protocol d'immunoprecipitació descrit al manual *Antibodies, a laboratory manual* (Lane, 1998) amb petites modificacions. Com a tampó de lisi es van emprar 2 mL de tampó NP40 (10 mM HEPES, 142 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0,2 % NP-40 (Nonident P40, Sigma), pH 7,4), al que s'hi van addicionar 10 µL de PIC en el moment de la seva utilització. Al sobrenedant resultant de la lisi de cèl.lules HEK293T que sobreexpressaven HA-Nod2 o HA-Nod2L1007fs (2 plats de Petri de 150 mm) s'hi van afegir 30 µL de proteïna G-agarosa (1 µg/µL, Sigma), per tal d'eliminar qualsevol component capaç d'interaccionar inespecíficament amb proteïna G. El sobrenedant recuperat per centrifugació de la solució anterior es va incubar durant 3 h a 4 °C amb 10 µL del mateix anticòs anti-HA emprat a l'apartat anterior. A continuació es va incubar durant 1 h a 4 °C amb agitació suau en presència de 30 µL de proteïna G - agarosa. Es va recuperar l'agarosa per centrifugació, i es va rentar tres cops amb 1 mL de tampó NP-40, tres cops amb 1 mL de tampó d'elevada força iònica RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay buffer*, 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,4 M EDTA, 10 % glicerol, 1 % NP-40, pH 8,2), tres cops amb 1 mL de tampó de baixa força iònica A1 (20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5), i finalment tres cops amb 1 mL de tampó 10 mM fosfat de sodi, pH 6,8. A continuació es va procedir a eluir la proteïna que restava unida a l'agarosa per tractament (5 min a Tamb) de l'agarosa recuperada per centrifugació, amb 100 µL d'una dissolució 100 mM de Glicina, pH 2,5. Finalment 80 µL del sobrenedant recuperat per centrifugació, s'hi van afegir sobre 1 mL de tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A) (Chen, 2005) al que s'hi van addicionar 10 µL de PIC i 1 mM d'ATP<sub>γ</sub>S. A continuació es va procedir a dur a terme la precipitació amb MTP-Biotina, tal i com es detalla a l'apartat anterior.

### 7.3. Assaigs d'entrecreuament.

#### 7.3.1. Obtenció del Muramil dipèptid (MDP) o Muramil tripèptid (MTP) units al reactiu d'entrecreuament (XL), MDP-XL i MTP-XL.

Es va seguir el protocol descrit al manual *ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit (Pierce)* amb petites modificacions. Donada la fotosensibilitat del reactiu d'entrecreuament emprat, Sulfo-SBED (Sulfosuccinimidil-[2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)hexanoamido]etil-1,3'-ditiopropionat, XL), es va treballar en absència de llum al llarg de tot l'experiment.

Per obtenir una dissolució 40 µg/µL de Sulfo-SBED, es van dissoldre 2 mg del reactiu (2,3 µmol, 880 g/mol) en 50 µL de DMSO, els quals s'hi afegiren sobre 400 µL d'una dissolució que contenia 0.22 mg de MDP (0,45 µmol, 492 g/mol) o 0.40 mg de MTP (0,45 µmol, 887 g/mol) en PBS, de forma que es mantenia una relació molar 1:5 (MDP/MTP : Sulfo-SBED). La barreja de reacció s'incubà a Tamb durant 5 min, 30 min o 1 h, amb agitació suau. A continuació, es van aplicar 200 µL sobre un filtre d'exclusió molecular (*Zeba Desalt Spin columns, Pierce*) per tal d'eliminar els reactius que no haguessin reaccionat. Es van enregistrar els valors de l'absorbància a 280 nm d'alíquotes corresponents a la barreja de reacció abans i després de la filtració. Les dissolucions de MDP-XL i MTP-XL resultants es van guardar a -20 °C protegides de la llum.

#### 7.3.2. Assaigs d'entrecreuament emprant lisats cel.lulars

A 500 µL de lisats de cultius HEK293T que sobreexpressaven HA-Nod2, HA-Nod2L1007fs, HA-Nod2ΔLRR o Nod1, obtinguts segons es descriu a l'apartat 7.1.3, s'hi van addicionar 112 µL d'una dissolució de MDP-XL o MTP-XL, preparada segons s'indica a l'apartat anterior. Com a tampó de lisi i incubació amb el MDP-XL o MTP-XL es va emprar el tampó d'unió MDP-Calreticulina-(B+) (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4, 1 mM ATP<sub>γ</sub>S i 10 µL PIC) (Chen, 2004). Igualment es van fer assaigs emprant el tampó anterior al que s'hi va afegir 0,005% de Tween<sup>®</sup>-20 (Sigma), tampó d'unió MDP-Calreticulina-(B+), o 50 mM Glicina, tampó d'unió MDP-Calreticulina-(C). La solució resultant es va incubar amb agitació suau a Tamb durant 1 h en absència de llum, i posteriorment s'hi va aplicar llum UV (288 watts a 10 cm, 3 min). A continuació, la dissolució es va incubar amb 40 µL d'estreptavidina immobilitzada sobre agarosa CL-4B (1,025 g/mL, Fluka) durant 1 h a 4 °C mantenint agitació suau. L'agarosa recuperada per centrifugació, es va rentar dos cops amb 1 mL del tampó d'unió MDP-Calreticulina-(B+), quatre cops amb 1 mL d'aquest tampó 0,5

M NaCl, 1% Tritó-X-100, i finalment de nou dos cops amb 1 mL del tampó d'unió MDP-Calreticulina-(B+). Finalment, s'hi van afegir 40 µL de tampó de càrrega i les mostres es van conservar a -20 °C fins el moment d'analitzar-les per SDS-PAGE, fent la detecció per *Western-Blot* emprant els Ab antiHA i antiAb per a la detecció, com s'ha descrit a l'apartat 7.2.1.

### 7.3.3. Assaigs d'entrecreuament emprant cultius cel.lulars.

Es va substituir el medi DMEM de cultius HEK293T que sobreexpressaven HA-Nod2 o HA-Nod2ΔLRR (2 plats 150 mm per experiment) per 10 mL de medi DMEM fresc i s'hi van addicionar 45 µL de la dissolució de MTP-XL. Es va incubar durant 2 h en absència de llum i a continuació es va retirar el medi de cultiu per tal d'aplicar llum UV (288 watts, 3 min a 10 cm) directament sobre les cèl.lules. Immediatament després s'hi afegien 5 mL de PBS a cada placa i es recolliren les cèl.lules. El sobrenedant resultant de la lisi cel.lular, es va incubar amb 40 µL d'estrepavidina immobilitzada sobre agarosa CL-4B (1,025 g/mL, Fluka), segons s'ha descrit a l'apartat anterior. Les mostres resultants es van analitzar per SDS-PAGE, fent detecció per *Western-blot*, com ja s'ha descrit, i amb tinció amb plata.

### 7.3.4. Assaig d'activació de NFκB: assaig de la luciferasa.

Es van fer cultius de cèl.lules HEK293T en una placa de 24 pous (4x10<sup>4</sup> cèl.lules per pou) que es van deixar créixer 24 h. A continuació, les cèl.lules van ser cotransfectades amb 5 ng del gen *reporter* pBVIx-Luc, 10 ng pEF-BOS-β-gal, 0,5 ng de pMX-HA-Nod2 i 380 ng de pcDNA3 (Ogura, 2001b; Inohara, 2000). Per dur a terme la transfecció, per a cada pou es va preparar una barreja que contenia les quantitats d'ADN indicades anteriorment juntament amb 19,2 µL de medi DMEM i 4 µL del reactiu *PLUS Reagent* (Invitrogen). Aquesta barreja es va incubar durant 15 min a Tamb i a continuació s'hi van afegir 25 µL de medi DMEM i 1 µL del reactiu *lipofectamine* (Invitrogen). La mescla final resultant es va incubar 15 min a Tamb i s'hi va afegir gota a gota sobre cada pou de cultiu cel.lular, als que prèviament s'havia bescanviat el medi de cultiu per 200 µL de medi DMEM+ fresc. Es va incubar durant 3 h a 37 °C. A continuació, es va substituir el medi de cultiu per 1 mL d'una dissolució en medi DMEM+ que contenia 1000, 100, 10 o 1 ng/mL de MDP-XL o MTP-XL, o bé 100, 10 o 1 ng/mL del MDP emprat com a control. Es van fer triplicats per a cada concentració i un control addicional on no s'hi adicionava cap estímul. Els cultius cel.lulars es van incubar durant 16-18 h, i a continuació es va mesurar l'activitat de la

luciferasa. Es va retirar el medi i s'hi van afegir 100  $\mu\text{L}$  de *Reporter lysis buffer* (Promega) a cada pou. Es va incubar amb agitació suau durant 30 min a Tamb. Una alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cadascun dels lisats es va transferir a un plat de 96 pous blanc (Corning) per tal de mesurar l'activitat de la luciferasa emprant l'aparell LMax Luminometer (Molecular Devices). Igualment es va procedir a determinar l'activitat  $\beta$ -galactosidasa, per tal de normalitzar els valors enregistrats per a l'activitat luciferasa. Així, una alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de cadascun dels lisats es va transferir a un plat de 96 pous (Corning) al que s'hi van afegir 90  $\mu\text{L}$ /pou de la solució  *$\beta$ -Gal lysis buffer* (Promega). La placa es va incubar a 37 °C fins que els lisats adquiriren un color groc, moment en que s'aturà la reacció per addició de 100  $\mu\text{L}$  d'una dissolució 1 M  $\text{NaCO}_3$ . A continuació es va registrar el valor de l'absorbància a 420 nm. Finalment es van normalitzar els valors mesurats per a l'activitat de la luciferasa respecte els valors de l'eficiència de transformació enregistrats per la  $\beta$ -galactosidasa.

#### 7.4. Columnes d'afinitat de MDP i MTP.

Per a l'obtenció de les columnes d'afinitat de MDP i MTP es van emprar el *MicroLink™ Protein Coupling kit* (Pierce) pels assaigs preliminars de purificació, i *AminoLink® Plus Immobilization Kit* (Pierce), per a purificacions a major escala. En tots dos casos es va seguir el protocol comercial amb petites modificacions.

##### 7.4.1. Preparació de les columnes d'afinitat.

En primer lloc es va procedir a equilibrar l'agarosa de cada columna amb 10 mL de tampó d'acoblament (100 mM citrat de sodi, 50 mM carbonat de sodi, pH 10,0). L'etapa d'acoblament es va dur a terme a pH 10, per augmentar la seva eficiència. A continuació s'hi van aplicar 2 mL d'una dissolució de MDP o MTP (1 mg/mL). Es va incubar durant 4 h a 4 °C mantenint agitació suau i es va rentar amb 10 mL del tampó neutre d'acoblament (100 mM fosfat de sodi, 150 mM NaCl, pH 7,2). A continuació s'hi van afegir 2 mL més del tampó anterior i 40  $\mu\text{L}$  de la solució de cianoborohidrur de sodi (5 M, dissolt en 0,01 M NaOH) i es va incubar O/N a 4 °C mantenint agitació suau. Es va rentar amb 4 mL del tampó de *quenching* (1 M Tris-HCl, 0,05 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7,4), s'hi van aplicar 2 mL d'aquest mateix tampó al que s'hi havien addicionat 40  $\mu\text{L}$  de la solució de cianoborohidrur de sodi, i es va incubar a Tamb durant 30 min, mantenint agitació suau. Posteriorment es va rentar el gel amb 20 mL de la solució de rentat (1 M NaCl, 0,05 %  $\text{NaN}_3$ ), i finalment amb 20 mL del tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A).



#### 7.4.2. Purificació per afinitat.

A cada columna d'afinitat, preparada segons es descriu a l'apartat anterior, s'hi van aplicar 2 mL de lisats cel·lulars, obtinguts a partir de 20 plats de 150 mm de cultius de cèl·lules HEK293T que sobreexpressaven HA-Nod2, i es van incubar O/N a 4 °C mantenint agitació suau. Els lisats s'obtenien segons el procediment descrit a l'assaig de precipitació de MDP-biotina (apartat 7.2), emprant com a tampó de lisi el tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A) suplementat amb 1 mM d'ATP $\gamma$ S o ATP, i 10  $\mu$ L PIC. A continuació, es va procedir a rentar amb 10 mL del tampó de lisi, 5 mL del mateix tampó 0,5 M NaCl i 10 mL del tampó d'unió 0,8 M NaCl. Es va equilibrar amb 10 mL del tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A) i s'hi van aplicar 2 mL del tampó d'elució (tampó d'unió MDP-Calreticulina-(A) suplementat amb 10  $\mu$ M o 100  $\mu$ M de MDP (Chen, 2005), 10 o 100  $\mu$ M LL-MDP, PIC i 1 mM d'ATP $\gamma$ S o ATP). Es va recuperar la solució resultant de la incubació amb agitació suau, O/N a 4 °C. Alíquotes de 20  $\mu$ L dels eluïts finals, així com dels lisats de partida, de la fracció no retiguda i de l'últim rentat es van analitzar per electroforesi SDS-PAGE amb gels al 12,5% d'acrilamida, i es va fer detecció per *Western-blot*, emprant l'Ab primari antiHA i com Ab secundari l'antiAb ja esmentats, així com per tinció amb plata.

#### 7.5. Clonatge i assaigs d'expressió i purificació del domini LRR de Nod2 i Nod2L1007fs.

##### 7.5.1. Clonatge del domini LRR de Nod2 i Nod2L1007fs.

Es van realitzar reaccions de PCR emprant els plasmidis pcDNA3(HA-Nod2) i pcDNA3(HA-Nod2L1007fs) (Ogura, 2001a, 2001b) com a motlles de les reaccions per obtenir les construccions pcDNA3(FLAG-Nod2LRR) i pcDNA3(FLAG-Nod2L1007fs-LRR). Les barreges de reacció es prepararen segons s'indica a la Taula 7. Posteriorment s'hi afegiren 0,5  $\mu$ L de polimerasa *Vent* (2 U/ $\mu$ L, NewEnglandBiolabs). Els oligonucleòtids emprats com a encebadors (Taula 8) procediren de Invitrogen. Els dADN emprats com a motlle i els plasmidis mutants resultants es descriuen a la Taula 9. Els paràmetres de les reaccions de termociclació van ser els següents: inici: 5 min a 95 °C.; 30 cicles: 30 s a 95 °C, 1 min a 62 °C, 1 min a 72 °C; final: 72 °C 10 min, llavors 4 °C.

**Taula 7.** Composició de les barreges de reacció per PCR.

Reactius	Volums de reacció
Tampó reacció (10x)	5 µL
dADN motlle	1 µL (10 ng/µL)
encebador 5' (60 µM)	3,3 µL
encebador 3' (30 µM)	6,7 µL
Barreja dNTP (10 mM, Roche)	1 µL (200 µM)
H <sub>2</sub> O mili-Q	33 µL

**Taula 8.** Seqüència dels encebadors emprats per a l'obtenció de les construccions derivades de Nod2 i Nod2L1007fs. Les seqüències indicades corresponen als oligonucleòtids sentit, *se*, o antisentit, *ase*. Valors de T<sub>m</sub> calculats segons la fórmula presentada a l'apartat 1.5.4.

encebador	Seqüència	T <sub>m</sub>
prSpeN2744 <i>se</i>	5'-CCTGGGCCTGGAGGACCTCTTTGATACCCATGGTCACC-3'	87
prN2R1 <i>ase</i>	5'-CACTGAGCTCCAGGGACGCCAGACTCTTGTGTG-3'	82
prN21007fsR1 <i>ase</i>	5'-TTGAATTCAAGAGGGCCTGCAGGAG-3'	77

**Taula 9.** ADN motlle i encebadors emprats per a l'obtenció de les construccions derivades de Nod2 i Nod21007fs.

motlle	encebadors	dADN resultant
pcDNA3(HA-Nod2)	prSpeN2744 <i>se</i> prN2R1 <i>ase</i>	Nod2LRR
pcDNA3(HA-Nod2L1007fs)	prSpeN2744 <i>se</i> prN21007fsR1 <i>ase</i>	Nod2L1007fs-LRR

Un cop es va comprovar que la mida dels fragments amplificats era la correcta, mitjançant l'anàlisi per electroforesi en gel d'agarosa, es va procedir a purificar l'ADN dels crús de reacció emprant el *High pure PCR product purification kit* (Boehringer Mannheim), seguint les instruccions indicades en el *kit*. Seguidament, alíquotes de 25 µL dels dADN purificats a partir de les reaccions de PCR (Taula 9) es van tractar amb 1 µL de SpeI (10 U/µL) i 1 µL d'EcoRI (10 U/µL) durant 2 h a 37 °C. Igualment, es van digerir 2 µg del vector pcDNA3-FLAG, derivat de pcDNA3 (Invitrogen), amb 1 µL de XbaI (10 U/µL) i 1 µL d'EcoRI, durant 2 h a 37 °C. A continuació es van incubar els crús de reacció 20 min a 65 °C, per tal de dur a terme la inactivació tèrmica dels enzims de restricció, i seguidament es va procedir a fer les lligacions del vector amb cadascun dels fragments provinents de les reaccions de PCR emprant el *Rapid DNA Ligation kit* (Roche) i seguint les recomanacions del fabricant. Alíquotes dels crús de

lligació es van emprar per transformar alíquotes de 100 µL d'E.coli DH5α (*Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells*, Invitrogen) seguint també les instruccions del fabricant.

### 7.5.2. Cribratge per PCR i digestió amb enzims de restricció.

Per a cada reacció, es va emprar com a font d'ADN motlle una de les colònies crescudes a partir de les cèl.lules transformades amb els crús de les reaccions de lligació. Cadascuna de aquestes colònies emprades com a font d'ADN motlle, es sembrava simultàniament en una nova placa LBamp, que es va deixar créixer a 37°C O/N. Igualment es van preparar reaccions control on no s'hi va afegir cap colònia, o es va fer servir 1 ng de pcDNA3, pcDNA3(HA-Nod2) o pcDNA3(HA-Nod2L1007fs) com a ADN motlle. Els oligonucleòtids emprats com a encebadors van ser prSpeNod2744, prNod2R1 i prNod21007fsR1 (Taula 8). Les barreges de reacció es van preparar tal com s'especifica a la Taula 10, i a cadascuna d'elles s'hi va afegir 1 U de Taq polimerasa (5 U/µL, Invitrogen). Les condicions de les reaccions de termociclació van ser les mateixes que es descriuen a l'apartat anterior.

**Taula 10.** Composició de les reaccions de PCR emprades per al cribratge de les lligacions.

Reactius	Volums de reacció
Tampó reacció (10x)	2 µL
encebador 5' (60 µM)	0,25 µL
encebador 3' (30 µM)	0,5 µL
Barreja dNTP (10 mM, Roche)	0,5 µL
H <sub>2</sub> O mili-Q	15,75 µL

Alíquotes de 10 µL dels crús de reacció s'analitzaren per electroforesi en gel d'agarosa. Pels clons que van donar lloc a un fragment de la mida esperada (0,9 Kb), es va amplificar l'ADN i es va confirmar per seqüenciació al servei de seqüenciació *DNA sequencing core* (*University of Michigan*, Ann Arbor, EUA).

Adicionalment, es van emprar també reaccions de digestió de l'ADN provenint dels clons generats segons s'ha descrit a l'apartat 7.5.1 amb l'enzim de restricció ApaLI. Com abans, per els clons que van donar lloc a un fragment de la mida esperada (0.9 Kb), es va amplificar l'ADN i es va seqüenciar.

### 7.5.3. Assaigs preliminars d'expressió i purificació.

Es van transfectar (apartat 7.3.4) cultius cel.lulars de HEK293T (2 plats de Petri de 150 mm per experiment) amb 20 µg de pcDNA3(FLAG-Nod2LRR) i 20 µg de pcDNA3(FLAG-Nod2L1007fsLRR). Igualment es van fer cultius control sense transfectar o tranfectats amb 20 µg de pFLAGYopM. YopM és una proteïna efectora de *Yersinia* que consta únicament de LRRs (McDonald, 2003) Es van obtenir els lisats cel.lulars d'aquests cultius (apartat 7.1.3), emprant 1 mL de tampó de lisi (Tris-HCl 20 mM, 150 mM NaCl, 1 % glicerol, 0,2 % NP-40, pH 7,4) al que s'hi va afegir 10 µL de PIC en el moment de la seva utilització. Als sobrenedants obtinguts, s'hi van afegir 100 µL d'*anti-FLAG-M2-agarose* (Sigma) i es van incubar durant 4 h a 4 °C mantenint agitació suau. Es va recuperar la resina per centrifugació i es va rentar cinc cops amb 1 mL del tampó de lisi i cinc més amb 1 mL del mateix tampó suplementat amb 250 mM NaCl. Finalment es va procedir a eluir les proteïnes retingudes a la columna per incubació amb 1 mL d'una dissolució 0,5 mg /mL de *FLAG<sup>®</sup> peptide* (Sigma) en el mateix tampó de lisi anterior (O/N, 4 °C, agitació suau). Es va recuperar el sobrenedant i es va analitzar per SDS-PAGE fent una detecció per Western-Blot amb l'Ab monoclonal Anti-FLAG M2 (4,9 mg/mL, Sigma).

## 7.6. Assaigs preliminars per a la determinació de la localització subcel.lular del MDP.

### 7.6.1. Assaigs de localització per immunofluorescència emprant MDP-XL o MTP-XL.

Es van fer créixer cultius de cèl.lules HEK293T que sobreexpressaven HA-Nod2, en plats de 24 pous (1\*10<sup>4</sup> cèl.lules/ pou). Prèviament s'havia disposat un cobreobjectes a cada pou, i s'havien esterilitzat per irradiació amb llum UV durant 15 min. Transcorreguts dos dies des de l'inici del cultiu, s'hi va afegir el volum requerit de les dissolucions de MDP-XL o MTP-XL (apartat 7.3.1) per tal de tenir una concentració final 1 µg/mL o 3 µg/mL d'aquests. Es van incubar durant 30 min o 2 h en absència de llum, i a continuació es van irradiar amb llum UV (288 watts, 3 min a 10 cm). Addicionalment es van fer experiments control amb cultius on no s'hi afegia cap inductor. Es van fer triplicats de cada experiment. A continuació es va procedir a la fixació les cèl.lules segons es descriu a l'apartat 7.6.3.

### 7.6.2. Assaigs de localització emprant el derivat fluorescent MDP-FITC.

Es van fer cultius de MBMM (apartat 7.1.4) en una placa de 24 pous (1-2.5\*10<sup>5</sup> cèl.lules/pou). Transcorregudes ~16 h des de l'inici del cultiu, es va substituir el medi de cultiu per 250 µL de BMDM fresc, i es van incubar amb 20 µg/mL de MDP-FITC

(verd, cedit per Geert-Jan Boons, Universitat de Georgia) a 37 °C, durant 30 min o 3 h, evitant l'exposició a la llum. Addicionalment es van incubar amb 1 µg/mL de Lyotracker Red DND-99 (1 mM, Molecular Probes) o 1 µg/mL Texas Red® conjugat a ovoalbúmina (Molecular Probes), durant 30 min a 37 °C. A continuació es va rentar dos cops amb medi Iscove's (Gibco), i es bescanvià el medi d'incubació per medi BMDM fresc, i es va incubar durant 30 min més a 37 °C. Finalment es va procedir a fixar les cèl.lules segons es descriu a l'apartat 7.6.3. Paral·lelament es van realitzar assaigs en que es va dur a terme una preestimulació de les cèl.lules, mitjançant una preincubació amb 10 ng/mL de LPS (Sigma) durant 30 min a 37 °C (Kobayashi, 2004), 10 ng/mL TNF $\alpha$  (Sigma) O/N a 37°C (Kovayashi, 2004), 100 ng/mL de PMA (Sigma), 3 h a 37 °C (Muto, 2002), o citocalasina D (Sigma) 4 µM durant 30 min a 37 °C (Makoveichuk, 2004). Igualment es van fer controls per incubació amb 5 µg/mL de Dextrà-Fluoresceïna (70000 MW, Molecular Probes), 1 h a 37 °C (Tansey, 1998). En tots els casos, un cop transcorregut el temps d'incubació requerit, les cèl.lules es van fixar (apartat 7.6.3) i es van analitzar per microscòpia de fluorescència, emprant un microscopi *Olympus BX-51*, o per microscòpia de fluorescència confocal, emprant un aparell *Olympus Fluoview confocal laser scanning microscope*, del servei *University of Michigan Cell and Developmental biology* (Universitat de Michigan, Ann Arbor, EUA).

### 7.6.3. Fixació de cèl.lules per a la detecció per immunofluorescència.

Durant tot el procés s'havia de treballar evitant el contacte directe amb la llum. En primer lloc es van fer tres rentats dels cobreobjectes (Fisher Scientific), dipositats en una placa de 24 pous, amb PBS estèril (15 min, agitació suau). A continuació es va procedir a fixar les cèl.lules incubant-les 30 min a Tamb amb 250 µL de la solució de fixació. Per preparar 10 mL de la solució de fixació, a 7,5 mL de la solució fixació-A, s'hi afegien 2,5 mL paraformaldehid al 8 % (p/v) i 21,4 mg NaIO<sub>4</sub> i s'esterilitzava per filtració. Per preparar 40 mL de la solució fixació-A, a 20 mL de lisina 0,2 M, s'hi adicionaven 15,5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,4, i 4,5 mL de sacarosa al 40 % (v/v), i la dissolució resultant s'esterilitzava per filtració.

Posteriorment es van rentar amb PBS estèril i es va fer un tractament amb metanol fred durant 10 s. A continuació, es van fer dos rentats amb PBS i s'incubaven durant 30 min a Tamb amb una solució bloquejant, de l'1 % BSA en PBS. Es van tornar a fer dos rentats amb PBS, abans de procedir a la incubació amb una dissolució d'*Streptavidin-FITC* (0,5 mg/mL, Invitrogen) diluïda 1:200 en PBS a l'1 % (p/v) BSA. Es va tornar a rentar dues vegades amb PBS, i a continuació es va incubar 5 min a

Tamb amb 250  $\mu\text{L}$  d'una dissolució 1:3000 de 4',6'-diamino-2-fenilindole (DAPI, Molecular Probes) en PBS, i es va rentar vèries vegades amb PBS. Finalment es va procedir a fer el muntatge. Cada cobreobjectes es disposava amb la cara que contenia les cèl.lules sobre una gota del medi de muntatge *Prolong<sup>®</sup>Gold antifade reagent* (Molecular Probes) dipositada sobre un portaobjectes. Es va deixar assecar O/N i es van conservar a 4 °C mantenint-los en absència de llum.

## IV. RESULTATS i DISCUSSIÓ





# 1. PREPARACIÓ DE VARIANTS DE CITOCROM C DE LLEVAT DISSENYADES PER DOTAR-LES DE CAPACITAT PER INTERACCIONAR AMB APAF-1.

## 1.1. Introducció.

Tal com s'ha descrit a la Introducció General, a l'inici del present treball, a la literatura s'havien reportat una sèrie d'observacions que posaven de manifest quins són els determinants estructurals presents als citocroms de mamífers responsables de la seva capacitat per interaccionar amb l'Apaf-1 i donar lloc a l'apoptosoma actiu. Aquestes observacions eren les següents:

1 – La interacció entre Cit c i Apaf-1 és de caràcter marcadament electrostàtic i no depèn de la capacitat del citocrom per transferir electrons.

2 – Els citocroms de diferents espècies de vertebrats són equivalents en quant a la seva capacitat per induir el processament de les procaspases 3 i 9, però no així el citocrom c de llevat.

3 – Els residus de lisina en posicions 7, 25, 39 i 72, així com els residus 62-65 de HHCit c participen en la interacció amb Apaf-1. La mutació d'aquests residus dona lloc a una pèrdua progressiva de la capacitat per induir l'activació de caspases. Per contra, la introducció d'aquests residus a la seqüència de YCit c, junt amb la deleció de 5 residus de l'extrem *N*-terminal, dona lloc a mutants que arriben a igualar la capacitat proapoptòtica de HHCit c.

A més, tot i que amb la recent publicació de l'estructura de l'apoptosoma (Yu, 2005) s'ha pogut establir de forma inequívoca l'estequiometria 1:1 Cit c-Apaf-1, en el moment en que es va iniciar aquest treball, els resultats de les titracions de Zn-HHCit c amb Apaf-1 reportats per McLendon i col. (Purring, 1999; Purring-Koch, 2000) suggerien una estequiometria 2:1.

D'acord amb aquests precedents, i partint de la hipòtesi que mitjançant la introducció dels residus adequats a la seqüència de YCit c seria possible conferir-li la

capacitat per interaccionar amb Apaf-1 i inclús dotar-lo d'activitat proapoptòtica, es va decidir abordar la preparació d'una petita col·lecció de mutants de YCit c que incorporarien modificacions en la regió *N*-terminal que els aproximarien a la seqüència de HHCit c. La raó per concentrar-nos en aquesta regió de la proteïna es basava en les següents consideracions:

1 - El fragment 4-13 correspon a la primera hèlix amfipàtica de l'estructura dels citocroms, la qual conté un dels residus (Lys7) que participa en la interacció amb Apaf.

2 - El grup prostètic hemo c es troba també en aquesta regió, unit mitjançant enllaços tioèter a les cisteïnes en posicions 14 i 17. Es poden obtenir pèptids que mantinguin la unió a aquest grup prostètic per degradació proteolítica del corresponent citocrom, els quals es pot esperar que, en solució, adoptin una conformació propera a la que presenten quan es troben a la proteïna (Low, 1997).

3 - A pocs residus de distància del lloc d'unió de l'hemo c es troba un segon residu de lisina (Lys25) que també s'havia determinat com a participant en la interacció amb Apaf.

4 - El fragment 1-27 de la seqüència de HHCit c conté a més de les lisines en posicions 7 i 25, cinc lisines addicionals en posicions 5, 8, 13, 22 i 27 que li confereixen un caràcter fortament catiònic (punt isoelèctric estimat  $\sim 9,3$ ) i podrien establir múltiples interaccions amb una superfície que presenti abundància de residus àcids, com és el cas del domini WDR d'Apaf-1. D'altra banda, el fragment 1-27 de la seqüència de YCit c, un cop introduïts el residus de lisina en posicions 7 i 25, contindria també 7 residus catiònics (punt isoelèctric estimat  $\sim 10$ ).

D'acord amb això, en aquest capítol es descriu la preparació dels següents mutants de YCit c:  $\Delta$ /K27M,  $\Delta$ /A7K/K27M,  $\Delta$ /P25K/K27M,  $\Delta$ /A7K/P25K/K27M. Aquests mutants de citocrom, a més de la deleció ( $\Delta$ ) dels 5 primers residus de la seqüència de YCit c i la introducció de residus de lisina en posicions 7 i 25, incorporaven un residu de metionina en posició 27 per explorar l'obtenció dels corresponents pèptids derivats per degradació amb bromur de cianogen. Aquests pèptids mantindrien unit covalentment el grup hemo c, pel qual a partir d'ara, ens referirem a ells amb el nom d'hemopèptids, i potencialment podrien interaccionar amb l'Apaf-1, suposant un pas inicial per a l'obtenció de molècules sintètiques de menor entitat molecular, capaces de modular la interacció entre el Cit c i l'Apaf-1.

## 1.2. Obtenció de mutants de citocrom c de llevat.

El nostre laboratori disposava d'un sistema d'expressió en *E.coli* per al Cit c de llevat que permetia obtenir la proteïna recombinant de forma eficient, així com la generació de variants d'aquesta proteïna per tècniques de mutagènesi dirigida (Pollock, 1998). Aquest sistema està basat en el plasmidi pBPCYC1(wt)/3 (Apartat 1.5.1, Materials i Mètodes), facilitat pel laboratori del Prof. A. G. Mauk (U. de British Columbia, Vancouver). En aquest plasmidi es coexpressen el gen de l'iso-1-YCit c (CYC1), la seqüència i traducció del qual es troben a la Figura 17, i el de l'enzim citocrom c hemoliasa de llevat (CYC3). Aquest últim codifica l'enzim encarregat de dur a terme la unió covalent entre la protoporfirina IX i el lloc de reconeixement constituït per la seqüència -Cys-X-X-Cys-His- present a la seqüència del citocrom (Dumont, 1988). Estudis previs demostraven la necessitat de la coexpressió d'aquesta hemoliasa per incrementar l'eficiència de l'expressió del YCit c en *E.coli* (Pollock, 1998). Cal destacar que la utilització d'aquest sistema d'expressió no requereix l'addició d'un inductor per a l'expressió de la proteïna. Aquest fet permet que el microorganisme expressi el pèptid del citocrom a nivells basals, la qual cosa era preferible enfront d'una producció ràpida característica d'altres sistemes basats en el control de promotors com ara el T7. Això produiria una gran quantitat d'apoproteïna en un temps breu, el qual, donat que la protoporfirina IX necessària per a la construcció de l'holoproteïna és produïda a nivells basals al bacteri, no representava cap avantatge.

El primer pas en l'obtenció dels mutants desitjats fou l'obtenció del plasmidi pCYC1( $\Delta$ /K27M)/3, i a partir d'aquest es van preparar pCYC1( $\Delta$ /A7K/K27M)/3, pCYC1( $\Delta$ /P25K/K27M)/3, i pCYC1( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M)/3. Es va emprar un protocol convencional de mutagènesi dirigida, segons es descriu a l'apartat de Materials i Mètodes. La selecció de clons es va realitzar en base a un cribratge amb enzims de restricció. Tots els plasmidis presentaven una única diana BamHI, que permetia confirmar que la seva mida era correcta. La digestió amb NdeI permetia igualment confirmar la introducció de la mutació K27M, ja que en introduir aquesta mutació es va generar alhora una diana addicional per a aquest enzim, i la incubació amb EcoRI permetia verificar la deleció dels cinc primers residus, ja que eliminava una de les seves dianes. A la taula 11 es resumeixen els resultats esperats en cada cas. Finalment la introducció de les mutacions desitjades es confirmà per seqüenciació dels ADN's.

```

-5   T E F K A G S A K K G A T L F   10
    ACTGAATTCAAGGCCGGTTCCTGCTAAGAAAGGTGCTACACTTTTC
11   K T R C L Q C H T V E K G G P   25
    AAGACTAGATGTCTACAATGCCACACCGTGGAAAAGGGTGGCCCA
26   H K V G P N L H G I F G R H S   40
    CATAAGGTTGGTCCAAACTTGCATGGTATCTTTGGCAGACACTCT
41   G Q A E G Y S Y T D A N I K K   55
    GGTCAAGCTGAAGGGTATTTCGTACACAGATGCCAATATCAAGAAA
56   N V L W D E N N M S E Y L T N   70
    AACGTGTTGTGGGACGAAAATAACATGTCAGAGTACTTGACTAAC
71   P K K Y I P G T K M A F G G L   85
    CCAAAGAAATATATTCTGTTACCAAGATGGCCTTTGGTGGGTTG
86   K K E K D R N D L I T Y L K K   100
    AAGAAGGAAAAAGACAGAAACGACTTAATTACCTACTTGAAAAAA
101  A T E
    GCCACTGAG

```

**Figura 17.** Seqüència del gen de YCit c i seqüència peptídica corresponent. Aquesta seqüència correspon a la d'una variant que presenta la mutació C102T, tot i que a efectes del present treball es pot considerar equivalent al citocrom salvatge (Pollock, 1998). La numeració està basada en la dels citocroms de mamífers, de manera que als cinc residus addicionals en l'extrem N-terminal els hi corresponen números negatius.

**Taula 11.** Mida (Kbp) i nombre dels fragments esperats en la digestió amb enzims de restricció dels diferents ADN recombinants.

Plasmidi	BamHI	NdeI	EcoRI
pBPCYC1(wt)/3	4,8	4,8	0,5
			0,6
			3,7
pCYC1( $\Delta$ )/3	4,8	4,8	1,1
			3,7
pCYC1(K27M)/3	4,8	1,7	0,5
		3,1	0,6
			3,7
pCYC1( $\Delta$ /K27M)/3			
pCYC1( $\Delta$ /A7K/K27M)/3	4,8	1,7	1,1
pCYC1( $\Delta$ /P25K/K27M)/3		3,1	3,7
pCYC1( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M)/3			

L'expressió dels diferents mutants de YCit c es va dur a terme inicialment a la soca d'*E.coli* HB2151. La purificació dels citocroms implicava dues separacions cromatogràfiques amb columnes de bescanvi catiònic. D'aquesta manera es van obtenir uns 5 mg de proteïna purificada per litre de medi pel YCit c (K27M), i entre 1

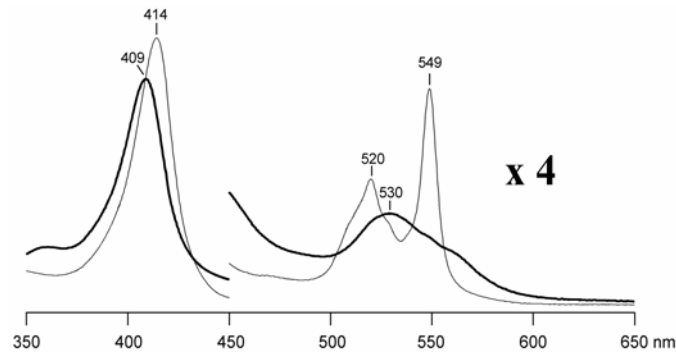
– 2 mg per litre per a la resta de proteïnes recombinants. Aquests rendiments van ser més baixos que els descrits a la literatura per a l'expressió del YCit c en *E.coli* (Pollock, 1998), el que es va atribuir a una menor estabilitat de les proteïnes recombinants, que possiblement les feia més susceptibles a l'atac per proteases. Per aquest motiu es va provar de substituir la soca d'*E.coli* HB5121 per la soca BL21(DE3) (Stratagene), amb fenotip *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(<sub>RB<sup>-</sup> MB<sup>-</sup></sub>) *gal*λ(DE3). Aquesta és una soca habitualment emprada per a l'expressió de proteïnes heteròlogues, sota control de promotors induïbles com T7, que permet un alt nivell d'expressió i fàcil control de la inducció, característiques no requerides en aquest cas tal com ja s'ha indicat. A més, com a soca d'*E.coli* B, és deficient en la proteasa Ion i en la proteasa de membrana ompT, que podrien degradar la proteïna durant la purificació. La substitució de la soca de bacteri emprada per dur a terme l'expressió va permetre un augment dels nivells d'expressió per un factor aproximat de 5 vegades per a totes les proteïnes recombinants. No obstant, la quantitat de proteïna obtinguda per al YCit c(K27M) sempre va ser superior que per a la resta de proteïnes que incorporaven mutacions addicionals (Taula 12).

**Taula 12.** Rendiments d'expressió (rdt, mg proteïna/L cultiu) obtinguts per a les diferents proteïnes recombinants derivades del YCit c. (A) Expressió a cèl.lules d'*E.coli* HB2151 (B) expressió a cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3).

Mutant YCitc	rdt (A)	rdt (B)
YCit c (K27M)	5	26
YCit c (Δ/A7K/K27M)	1	5
YCit c (Δ/P25K/K27M)	1	4
YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M)	1,2	6

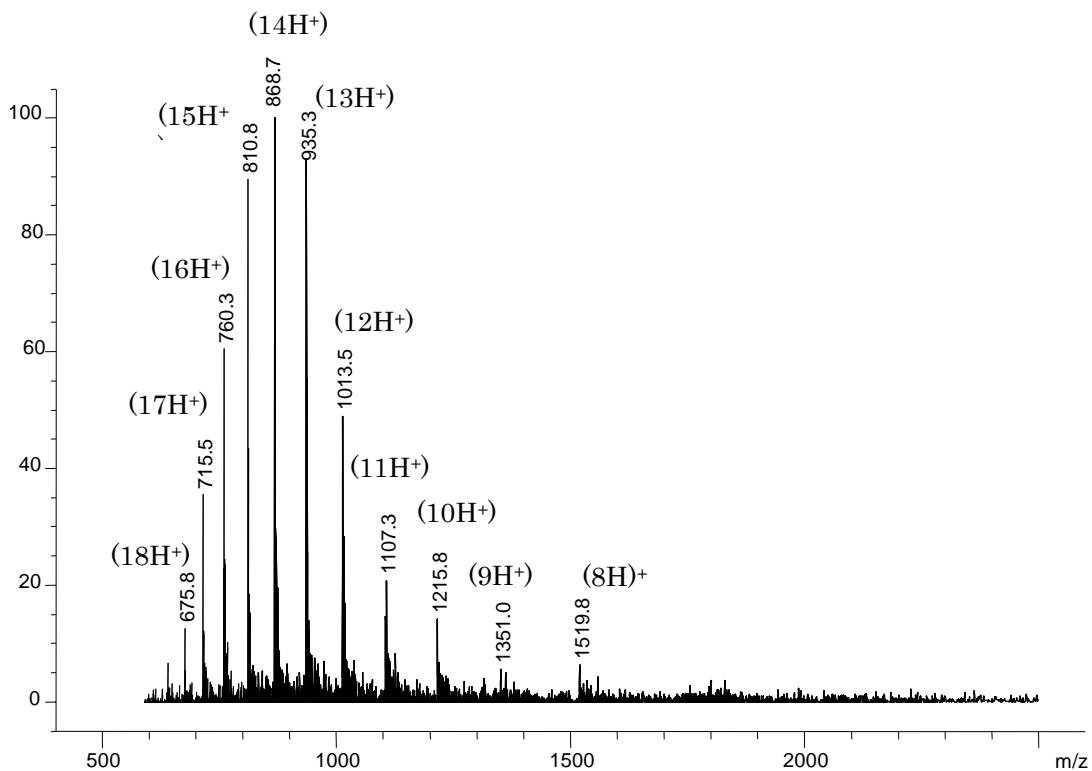
Per a tots els mutants, es van observar espectres d'absorció electrònica similars al de la proteïna salvatge (Figura 18), amb el màxim de la banda de Soret a 409 nm i de la banda de transferència de càrrega a 530 nm, que posaven de manifest l'estat oxidat (Fe<sup>3+</sup>) de l'àtom metàl·lic. Clàssicament, l'espectroscòpia d'absorció electrònica ha estat una eina molt útil al treball amb hemoproteïnes per extreure informació sobre la estructura entorn al grup prostètic. En el nostre cas, el fet que no s'observessin diferències entre els espectres dels mutants i el de la proteïna salvatge, va permetre descartar canvis en la coordinació del grup prostètic. D'altra banda, com a criteri de puresa dels citocroms durant la seva preparació, es va emprar el quocient de les absorcions a 409 i 280 nm o factor de puresa (RZ = 4,7 per YCit c i HHCit; Margoliash,

1959). Tots els citocroms recombinants, un cop purificats, van mostrar valors de RZ >4,5.



**Figura 18.** Espectres d'absorció electrònica de YCit c en estat oxidat (línia gruixuda) i reduït (línia prima).

L'anàlisi de les proteïnes per espectrometria de masses va proporcionar una confirmació addicional sobre la identitat dels mutants produïts. La Figura 19 il·lustra l'espectre de masses obtingut pel mutant YCit c ( $\Delta/A7K/K27M$ ). Els pesos moleculars determinats per ESI-MS es corresponien en tots els casos amb els esperats (Taula 13). Com a control també es va mesurar la massa del YCit c, prèviament expressat al nostre laboratori.



**Figura 19.** Espectre ESI-MS del mutant YCit c ( $\Delta/A7K/K27M$ ).

**Taula 13.** Masses teòriques i experimentals determinades per ESI-MS dels citocroms c recombinants obtinguts. L'error màxim en les mesures va ser  $\pm 3$  unitats de massa.

Citocrom c	Massa teòrica	Massa experimental
YCit c	12.666	12.666
YCit c ( $\Delta$ )	12.092	12.089
YCit c ( $\Delta$ /A7K/K27M)	12.149	12.148
YCit c ( $\Delta$ /P25K/K27M)	12.123	12.126
YCit c ( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M)	12.180	12.180

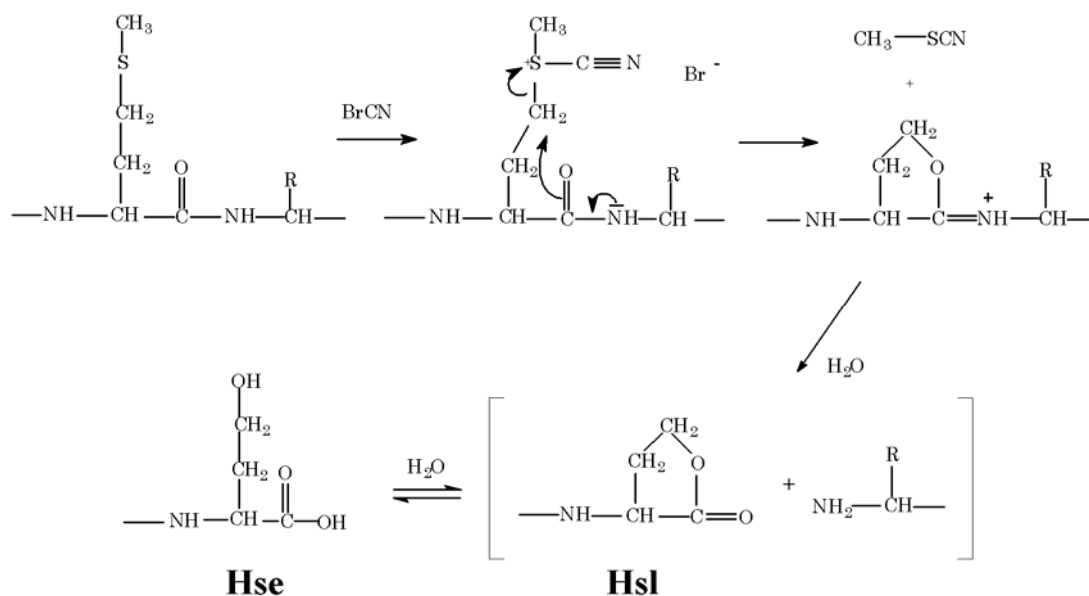
Es va dur a terme una caracterització més exhaustiva de tots els citocroms obtinguts emprant tècniques de diroïsmes circular, espectroscòpia d'absorció electrònica i  $^1\text{H}$ -RMN, la qual va permetre descartar canvis estructurals importants respecte a la proteïna salvatge. Els resultats d'aquesta caracterització es recullen en forma d'Apèndix al final d'aquesta memòria.

### 1.3. Obtenció de fragments peptídics derivats de citocrom c.

Com ja s'ha esmentat, un dels objectius plantejats consistia en l'obtenció de derivats de menor entitat molecular a partir de les proteïnes recombinants preparades. Amb aquesta finalitat, calia per tant posar a punt un mètode que permetés generar fragments peptídics que continguessin la seqüència *N*-terminal d'interès, incloent com a mínim els residus 7 i 25 i el lloc d'unió del grup hemo. La hidròlisi enzimàtica requeriria emprar enzims suficientment específics que no donessin talls a la regió d'interès, però que fossin suficientment eficients com per poder obtenir quantitats suficients dels hemopeptíds desitjats. Assaigs preliminars emprant enzims com prolidasa o endoproteïnasa Arg- C, que presenten un nombre de dianes adequat a la regió d'interès, havien donat resultats poc satisfactoris. Per aquest motiu és que s'havia optat per introduir un residu de Met en posició 27 en els mutants de YCit c, que permetria dur a terme la degradació química amb bromur de cianogen (BrCN) (Gross, 1967; Corradin, 1970).

El BrCN trenca selectivament, en condicions de pH àcid que desestructuren la proteïna, l'enllaç peptídic en el que intervenen residus de metionina, per generar una barreja d'homoserina (Hse) i homoserina lactona (Hsl) (Figura 20). També es coneix que en menor proporció actua sobre els residus de cisteïna, oxidant-los a àcid cistèic

(Gross, 1967). A la seqüència del YCit c n'hi ha només dos residus d'aquest aminoàcid a les posicions 64 i 80, que no suposaven un problema per als nostres propòsits.



**Figura 20.** Mecanisme de la reacció de degradació amb BrCN de l'enllaç peptídic Met– X.

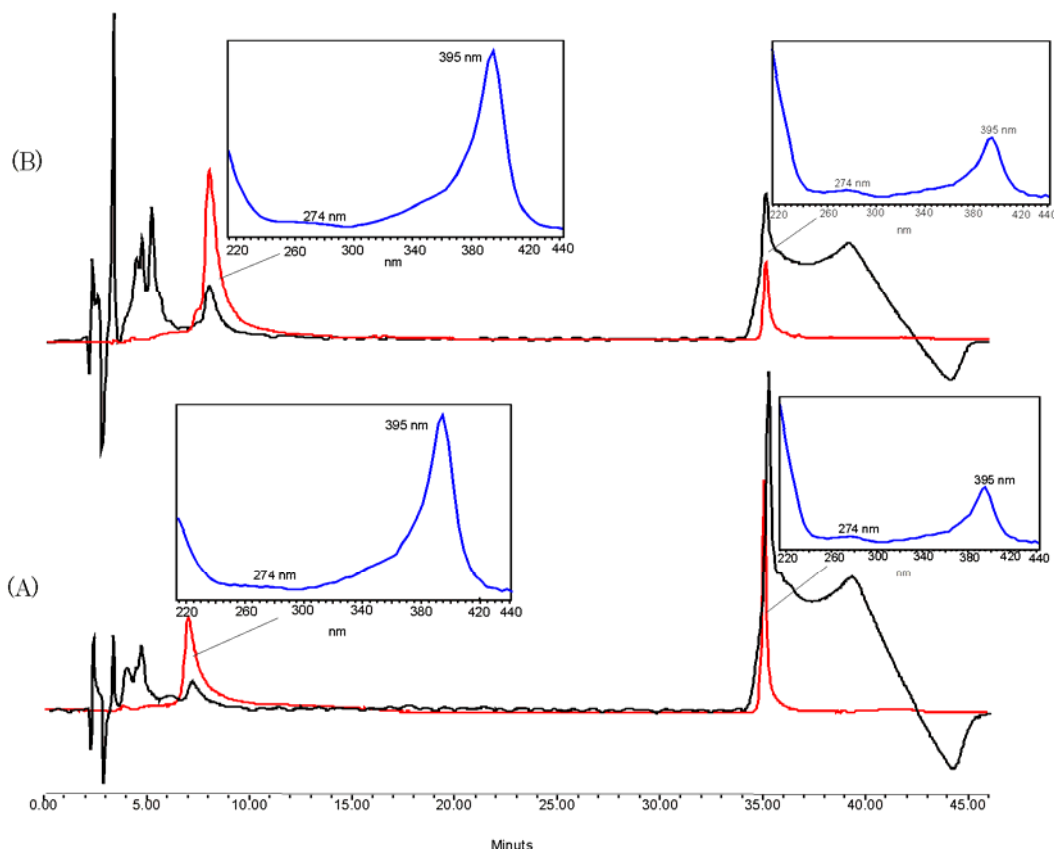
Es van dur a terme assaigs per posar a punt la degradació química amb BrCN. Es van establir les condicions de la reacció fent un assaig previ sobre HHCit c, el qual, de forma similar a YCit c, conté dos residus de Met a les posicions 65 i 80. D'acord amb la literatura, es va emprar àcid fòrmic 70 % com a dissolvent i una relació molar citocrom – BrCN 1:100 (Corradin, 1970). Els resultats observats en fer el seguiment de la reacció per HPLC monitoritzant l'absorció a 220 nm i 395 nm, posaven de manifest la formació de fragments derivats del trencament del citocrom. L'anàlisi per espectrometria de masses MALDI-TOF d'alíquotes dels crús a diferents temps de reacció va confirmar que aquesta degradació s'havia produït específicament als residus de metionina (Taula 14). Els espectres mostraven com a fragment majoritari un pic amb una relació massa/càrrega ( $m/z$ ) de 7.773, que es corresponia amb l'esperada per al fragment derivat del trencament a la Met 65 (Ac1-65Hse,  $m/z$  teòric 7.775). Es detectaren en menor proporció pics amb  $m/z$  12.356, atribuïble a restes de citocrom sense reaccionar ( $m/z$  teòric 12.361),  $m/z$  9.564, compatible amb el fragment derivat del trencament per la Met 80 amb C-Hse i l'*N*-acetil (Ac1-80Hse,  $m/z$  teòric 9568), i 7.162, fragment derivat del Ac1-65Hse per pèrdua del grup hemo (616 uma). No es va arribar a observar la desaparició dels pics corresponents al material de partida i al fragment derivat del trencament parcial (Ac1-80Hse), fet que es va



atribuir a l'oxidació dels residus de metionina al corresponent sulfòxid, que fa que esdevinguin inactius enfront al BrCN (Gross, 1967). Es per aquesta raó que és recomanable dur a terme la reacció sota atmosfera inert.

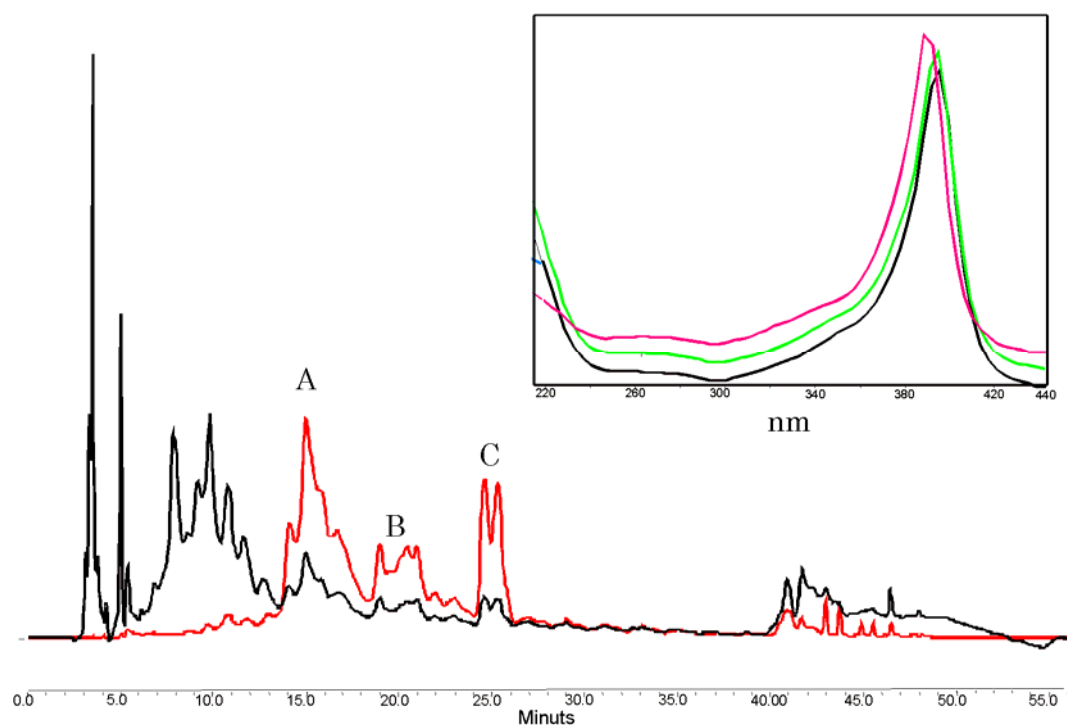
**Taula 14.** Masses teòriques i determinades per anàlisi de l'espectre MALDI-TOF de la reacció de degradació del HHCit c amb BrCN. <sup>(1)</sup>El trencament de la unió covalent amb el grup hemo, compatible amb l'aparició del pic a  $m/z$  7.162, podria tenir lloc no en el medi de reacció sinó durant el procés de vaporització-ionització en el MALDI (Carraway, 1993). No obstant, l'augment a temps de reacció més llargs (i.e. 50 hores) de la proporció d'aquest pic suggeriria el contrari. La naturalesa d'aquest trencament no es va investigar.

	Massa teòrica	Massa experimental
HHCit c	12.361	12.356
Ac1-80Hse	9.568	9.564
Ac1-65Hse	7.775	7.773
Ac1-65Hse sense hemo <sup>(1)</sup>	7.159	7.162

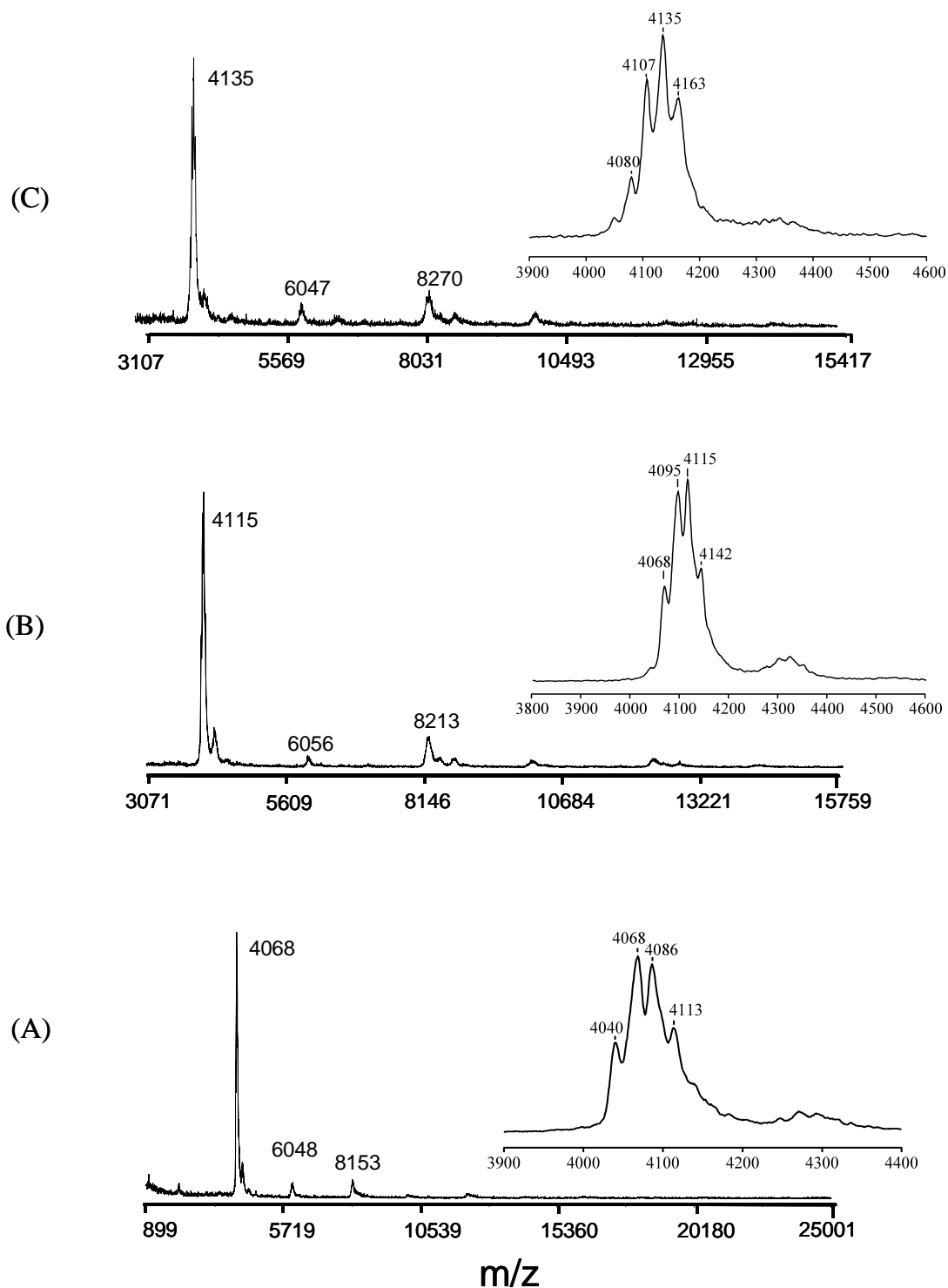


**Figura 21.** Cromatogrames d'HPLC enregistrats a 395 nm (—) i 220 nm (—) d'alíquotes a les (A) 4 hores i (B) 23 hores de la reacció del YCit c (K27M) processat amb BrCN, i espectres dels pics corresponents a  $t_R$  7,5 minuts i  $t_R$  35 minuts.

La reacció amb BrCN es va assajar de forma anàloga amb el mutant YCit c (K27M). El seguiment de la reacció per HPLC (Figura 21) va mostrar la desaparició del pic del citocrom de partida ( $t_R$  35 min) i la formació d'un pic majoritari que contenia les absorcions atribuïbles al grup hemo ( $t_R$  7,5 min). En aturar la reacció a les 24 hores i abordar la purificació del cru per HPLC semipreparativa es van obtenir cromatogrames (Figura 22) que indicaven una complexitat major de la que s'havia observat anteriorment (Figura 21). Això suggeria que el pic amb  $t_R$  7,50 minuts estava en realitat format per la suma de diferents pics, els quals es resolien millor en la columna semipreparativa i amb les noves condicions cromatogràfiques emprades. Així, en dur a terme la purificació per HPLC semipreparativa es van separar tres fraccions (Figura 22), corresponents als productes que presentaven un màxim d'absorció cap a 390 nm i que eluien entre 14-18 min (fracció A), 19-21,5 min (fracció B) i 24,5-26 min (fracció C). Aquestes fraccions, un cop liofilitzades, es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF (Figura 23).



**Figura 22.** Perfils de l'HPLC semipreparativa del cru de reacció YCit c (K27M) amb BrCN per a un temps de reacció de 25 hores, a 395 nm (—) i 220nm (—). Espectres enregistrats a  $t_R$  15 min (—) (fracció A),  $t_R$  21 min (—) (fracció B),  $t_R$  25 min (—) (fracció C).



**Figura 23.** Espectres de masses obtinguts per a les fraccions A, B i C separades per HPLC semipreparativa del cru de reacció entre YCit c (K27M) i BrCN. Per a cada espectre es mostra ampliada la regió corresponent al pic principal.

Les fraccions A, B i C estaven constituïdes majoritàriament per fragments amb una relació  $m/z \sim 4.100$ , si bé s'observaven també components minoritaris cap a  $m/z \sim 4300$ ,  $\sim 6.050$  i  $\sim 8.200$  (Figura 23). L'ampliació dels pics principals de cada fracció va revelar que en realitat estaven constituïts per, almenys, quatre pics solapats, que aparentment seguien una distribució, i que en el cas de la fracció A apareixien a  $m/z$

4.040, 4.068, 4.086 i 4.113, que no es podien interpretar només en base al trencament dels enllaços Met-X presents al YCit c (K27M) (Taula 15). Les diferències entre els quatre pics, de 28, 18 i 27 unitats de massa, semblaven suggerir que es podrien atribuir a productes derivats de la formilació, (+28 uma), dels fragments -5 -27Hse i -5 -27Hsl, o hidròlisi de la lactona (+18 uma).

**Taula 15.** Masses teòriques dels productes esperats de la degradació complerta del mutant YCit c (K27M) amb BrCN. En cada cas s'indica els valor esperat per als derivats amb l'extrem C-terminal en forma d'homoserina (Hse) i homoserinlactona (Hsl).

	Massa teòrica
-5 - 27Hse / -5 - 27Hsl	4.049 / 4.031
28 - 64Hse / 28 - 64Hsl	4.104 / 4.086
65 - 80Hse / 65 - 80Hsl	1.840 / 1.822
81 - 103Hse / 81 - 103Hsl	2.659 / 2.641

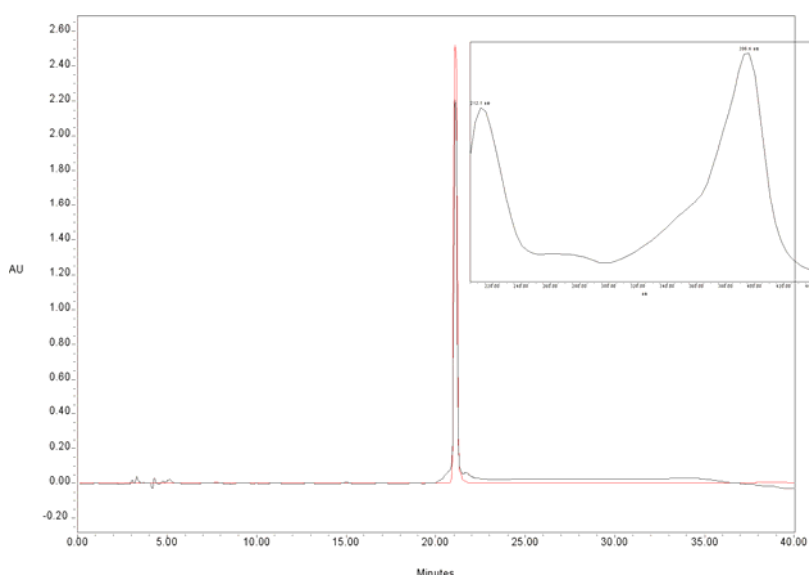
La formació d'aquests derivats tindria lloc per esterificació, catalitzada pel medi àcid de la reacció, de les cadenes laterals dels residus de serina i treonina amb l'àcid fòrmic emprat com a dissolvent (Goodlett, 1990; Duewell, 1998). El mutant YCit c (K27M) presenta 4 residus de Ser i 9 de Thr, mentre que en els fragments derivats del trencament per la Met27, hi ha 1 de Ser i 4 de Thr, a més del grup d'homoserina terminal en el cas de -5 - 27Hse. El grup fenòlic de la tirosina no resulta derivatitzat en aquestes condicions, així com tampoc ho són els grups  $\alpha$ - i  $\epsilon$ -amino o l'imidazole (Duewell, 1998). Igualment, la formació d'aquests components al cru de reacció explicaria la complexitat observada per HPLC, ja que l'addició del grup formil augmenta el caràcter hidrofòbic dels pèptids (Duewell, 1998) incrementant el seu temps de retenció.

Dels resultats obtinguts amb aquests assaigs d'hidròlisi amb BrCN, es va concloure que aquest procediment previsiblement permetria dur a terme el trencament dels mutants que continguessin la mutació K27M de forma selectiva i eficient, en el sentit de que els pèptids derivats de la hidròlisi parcial són minoritaris respecte el desitjat. No obstant, seria necessari exercir un control de la reacció per tal de minimitzar les reaccions secundàries. A la bibliografia es descriuen diversos tractaments senzills posteriors, per exemple incubació en tampó aquós a pH 6 i 37 °C durant 30 minuts, que permetrien obtenir els derivats no formilats dels pèptids esterificats resultants de la reacció en àcid fòrmic (Goodlett, 1990). D'altra banda, també es descriu la possibilitat de realitzar la reacció emprant com a dissolvent àcid trifluoroacètic (TFA) en lloc de fòrmic, evitant així la formació d'aquests èsters (Duewell, 1998).

#### 1.4. Degradació dels mutants de YCit c amb BrCN en medi de TFA.

Per tal d'evitar la formació de derivats formilats a les reaccions amb BrCN, es va repetir la reacció amb YCit c (K27M) substituint l'àcid fòrmic per TFA com a dissolvent. Els nous perfils cromatogràfics van ser molt més nets, indicant la formació d'un únic producte de reacció amb absorció a 395 nm (Figura 24). La purificació de l'hemopèptid es va dur a terme per HPLC. L'anàlisi per espectrometria de masses (ESI-MS) del producte majoritari va donar una relació  $m/z$  de  $4029 \pm 1$  uma, atribuïble al fragment HP -5-27Hsl sense cap modificació addicional (Taula 15).

Igualment, un cop es va disposar de les proteïnes recombinants obtingudes segons s'ha descrit a l'apartat 1.2., es va dur a terme la degradació en aquestes condicions del mutant YCit c ( $\Delta/A7K/P25K/K27M$ ), per tal de generar el corresponent hemopèptid. Inicialment es va abordar només la degradació d'aquest mutant, donat que era el que presentava major interès ja que contenia les dues mutacions objecte d'estudi. L'obtenció dels hemopèptids derivats dels altres mutants es va supeditar als resultats obtinguts amb aquest, en quant a la seva capacitat per interaccionar amb Apaf-1. Es va procedir seguint el mateix protocol emprat amb YCit c (K27M), amb el que es va observar un perfil cromatogràfic equivalent, amb formació d'un únic producte amb absorció a 395 nm. L'anàlisi per ESI-MS va confirmar que es tractava de l'hemopèptid desitjat (HP7K25K 1-27Hsl,  $m/z = 3541 \pm 1$  uma) amb un grup de homoserina lactona en el seu extrem *C*-terminal i sense cap més modificació addicional (Taula 16).



**Figura 24.** Cromatogrames enregistrats a 395 (vermell) i 280 nm (negre) per a l'anàlisi d'una alíquota del cru de la reacció de degradació del YCit c (K27M) amb BrCN en medi de TFA.

**Taula 16.** Masses teòriques per als productes esperats de la degradació complerta del mutant YCit c ( $\Delta/A7K/P25K/K27M$ ) amb BrCN. En cada cas s'indiquen els valors esperats per als derivats amb l'extrem C-terminal en forma d'homoserina i homoserinlactona.

	Massa teòrica
1 - 27Hse / 1- 27Hsl	3.559 / 3.541
28 - 64Hse / 28 - 64Hsl	4.104 / 4.086
65 - 80Hse / 65 - 80Hsl	1.840 / 1.822
81 - 103Hse / 81 - 103Hsl	2.659 / 2.641

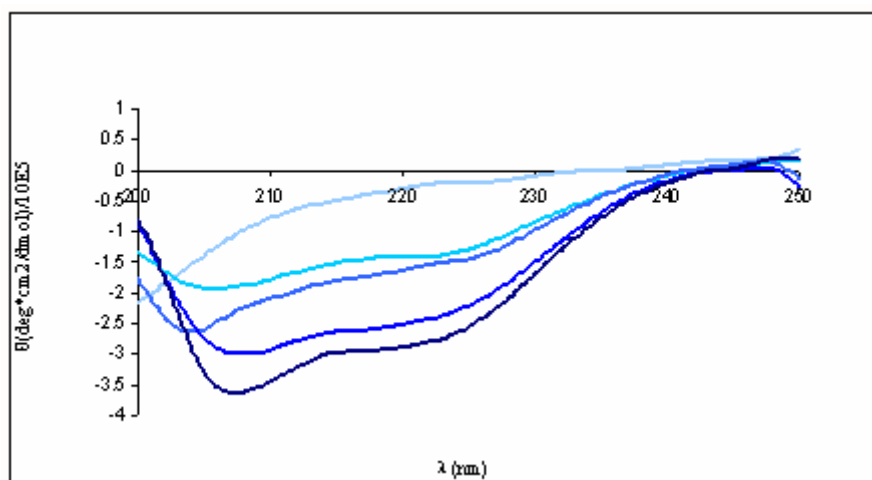
El coeficient d'extinció molar, determinat emprant el mètode de l'hemocrom (Antonini, 1964), va ser de  $\epsilon^{407} = 111 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 1.5. Caracterització dels hemopèptids per dicroisme circular.

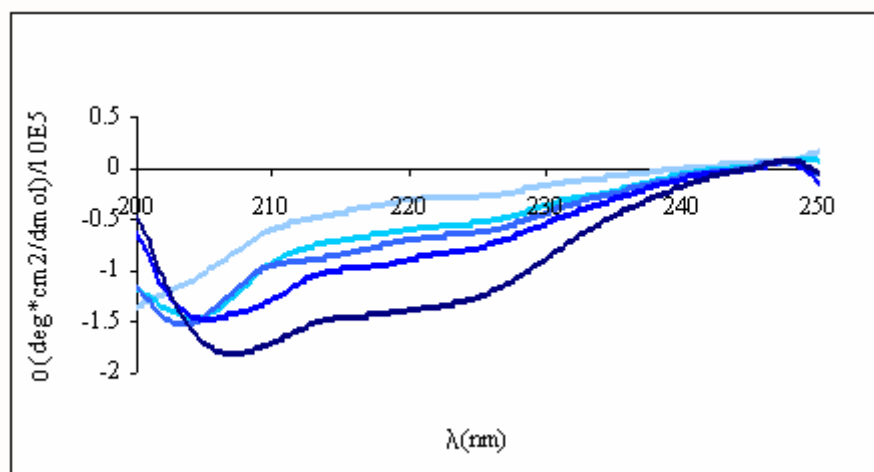
Per tal de determinar l'estructura secundària dels hemopèptids HP -5-27Hsl i HP7K25K 1-27Hsl, generats per degradació amb BrCN de YCit c (K27M) i YCit c ( $\Delta/A7K/P25K/K27M$ ), respectivament, es van enregistrar els corresponents espectres de dicroisme circular (DC).

En incidir un feix de llum polaritzada linearament sobre una mostra quiral, la llum transmesa passa a estar polaritzada el·lípticament. Aquest fenomen es pot quantificar mesurant l'el·lipticitat per donar els espectres de DC (Purdie, 1990). En el cas dels pèptids i proteïnes, l'el·lipticitat depèn de l'orientació relativa dels enllaços amida; per tant l'espectre de dicroisme circular depèn de l'estructura secundària present a la proteïna i permet detectar-ne canvis en la mateixa.

Es van enregistrar els espectres dels hemopèptids en tampó fosfat i amb percentatges creixents de trifluoroetanol (TFE). Aquest dissolvent és conegut com a inductor i estabilitzador d'estructura secundària (Sakamaoto, 1997; Zhou, 1992). Els pèptids de mida intermitja amb una tendència intrínseca per adoptar conformacions helicoïdals en medi aquós sovint mostren un gran increment de l'el·lipticitat com a resultat de l'addició de certs alcohols, entre els quals el TFE es mostra com un dels més eficients, tot i que el mecanisme pel qual afavoreix l' $\alpha$ -el·lipticitat és incert. Així, la titració amb TFE permet avaluar aquesta tendència (Cammers-Goodwin, 1996). Els resultats d'aquestes titracions es mostren a les figures 25 i 26.



**Figura 25.** Espectres de DC de l'HP -5-27Hsl enregistrat en presència de (—) 0, (—) 40, (—) 60, (—) 80 i (—) 100 % TFE.



**Figura 26.** Espectres de DC de l'HP7K25K 1-27Hsl enregistrat en presència de (—) 0, (—) 40, (—) 60, (—) 80 i (—) 90 % TFE.

Els espectres de DC enregistrats per als dos hemopèptids en solució aquosa són compatibles amb espècies essencialment desestructurades, de tipus cabdell estadístic. L'addició de proporcions creixents de TFE indueix l'aparició de bandes d'el·lipticitat molar a ~208 nm i 222 nm, característiques de conformacions de tipus  $\alpha$ -hèlix. Les restriccions conformacionals introduïdes per la presència del grup hemo podrien contribuir a estabilitzar aquestes conformacions més rígides, degut a l'existència d'interaccions entre el pèptid i el grup prostètic (Arnold, 1997; Sakamoto, 1997). De fet, és conegut que en hemopèptids similars, els grups funcionals del pèptid poden actuar com a lligands intra o intermoleculars de l'àtom metàl·lic del grup hemo (Adams, 1996).





## 2. OBTENCIÓ DE CONSTRUCCIONS DERIVADES D'APAF-1-XL: APAF-CARD-NOD/CED4 I APAF-WDR.

### 2.1. Introducció

Estudis preliminars duts a terme pel grup col.laborador del Dr. E. Pérez Payá (Malet 2004) per a la producció d'Apaf-1-XL emprant un sistema d'expressió basat en baculovirus, havien posat de manifest la considerable dificultat que comportava l'obtenció de l'esmentada proteïna en forma funcional i en suficient quantitat per dur a terme la reconstitució de l'apoptosoma *in vitro* i realitzar assaigs de cribratge de biblioteques de molècules orgàniques amb l'objectiu d'identificar moduladors de l'apoptosi. Tanmateix, això suposava també una limitació per a la realització dels estudis plantejats amb els mutants de YCit c i hemopèptids derivats que s'havien proposat en el context d'aquesta tesi.

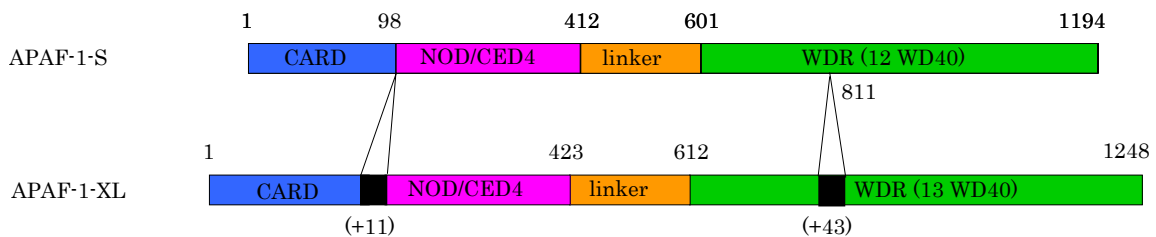
Per aquest motiu, es va considerar explorar l'obtenció de construccions derivades d'Apaf-1 que poguessin expressar-se de forma eficient i funcional en bacteri. En aquest sentit, a la literatura s'havia reportat la expressió en *E. coli* de diverses construccions d'Apaf-1, sovint corresponents a alguns dels dominis principals de la proteïna. En concret, Lauber i col. reportaven l'expressió en *E. coli* BL21(DE3) dels mutants de deleció 1-540 i 20-540 d'Apaf-1-S, en els que s'havia eliminat el domini WDR, clonats en el vector d'expressió bacteriana pET15b (Lauber, 2001). Prèviament, Zou i col. ja havien descrit la clonació i expressió del fragment que comprenia els aminoàcids 10-254 de l'Apaf-1-S a pET15b (Zou, 1997). Igualment, Srinivasula i col. van clonar en pET21b i expressar diversos mutants d'Apaf-1-S, entre els que es trobaven els fragments 1-530 i 530-1194, corresponents a la regió N-terminal, que inclou els dominis CARD i NOD/CED4, i la regió C-terminal, que conté el domini WDR (Srinivasula, 1998), mentre que Adrain i col. havien reportat la expressió de construccions derivades dels dominis CARD i NOD/CED4 fusionades a GST en *E. coli* DH5 $\alpha$  (Adrain, 1999). D'altra banda, el grup de G. Nuñez havia reportat també

l'expressió de construccions similars, si bé en aquest cas emprant cultius de cèl·lules de ronyó (Hu, 1998a, 1998b, 1999).

Basant-nos en aquests antecedents, vàrem proposar-nos dur a terme l'obtenció de dues construccions similars a les reportades en el treball de Srinivasula i col. però en el nostre cas derivades de Apaf-1-XL, la isoforma que com ja s'ha indicat a la Introducció General conté dues insercions, entre els dominis CARD i NOD/CED4 i en el domini WDR (Figura 27), i que es la més eficient en promoure l'activació de PC-9 i iniciar l'apoptosi. La primera d'aquestes construccions inclouria els dominis CARD i NOD/CED4, mentre que la segona inclouria el domini WDR, postulat com a responsable de la interacció amb citocrom c.

Disposar d'aquests dominis de forma independent permetria aprofundir en l'estudi del paper de cadascun d'ells en la interacció amb Cit c i amb altres molècules amb capacitat per modular la formació de l'apoptosoma, i alhora determinar les característiques físico-químiques d'aquestes interaccions.

Tal com mostra la Figura 27, els dominis CARD i NOD/CED4 d'Apaf-1-XL s'estenen entre els residus 1-423, mentre que el WDR compren els residus 612-1248. Totes dues regions estan unides per un fragment de gairebé 200 residus de llargada que s'havia postulat com a important, encara que no imprescindible, per a la autoassociació i activació de PC-9. Així, variants d'Apaf-1-S que comprenen els residus 1-559 i 1-455 (Hu, 1998a) o 1-530 i 1-420 (Srinivasula, 1998), s'havien mostrat capaces d'activar PC-9 de forma constitutiva, és a dir, independentment de Cit c i d'ATP/ATP. D'altra banda, s'havia demostrat la capacitat d'autoassociació i inducció d'apoptosi per a una variant d'Apaf-1-S que comprenia els residus 1-601 (Adrain, 1999). Observacions similars s'havien reportat per a una variant d'Apaf-1-XL que comprèn els residus 1-570 (Hu, 1999). Alhora, s'havia reportat la capacitat de construccions que contenen el domini WDR, comprènent els residus 530-1194 (Srinivasula, 1998) o 468-1194 (Hu, 1998a) d'Apaf-1-S o els residus 479-1248 d'Apaf-1-XL (Hu, 1999), per inhibir la autoassociació i l'activació de PC-9 promoguda per les construccions *N*- terminals (Srinivasula, 1998; Hu, 1998; Adrain, 1999).



**Figura 27.** Comparació de les isoformes d'Apaf-1, Apaf-1-S i Apaf-1-XL.

1 M D A K A R N C L L Q H R E A L E K D I K T S Y I M D H M I S D G F L T I S E E  
ATGGATGCAAAAGCTCGAAATTGTTTGTCTCAACATAGAGAAGCTCGGAAAAGGACATCAAGACATCCTACATCATGGATCAGATGATAGTGATGGATTTTAAACAATATCAGAAGAG

41 E K V R N E P T Q Q R A A M L I K M I L K K D N D S Y V S F Y N A L L H E G Y  
GAAAAGTAAGAATAGAGCCACTCAACAGCAAAGAGCAGCTATGCTGATTAAAAATAGTACTTAAAAAGATAATGATTCCTACGTCATCATTCTACAAATGCTCTACTACATGAGGATAT

81 K D L A A L L H D G I P V V S S S S G K D S V S G I T S Y V R T V L C E G G V P  
AAAGATCTTCTGCTCCCTTCTCCATGATGGCATTCTGTTGCTCTTCTTCCAGTGGAATGAGTTCAGTTAGTGAATAACTTCGATGTAAGGACAGTCTCTGTGGAAGGTTGAGTACCA

121 Q R P V V F V T R K K L V N A I Q Q K L S K L L K G E P G W V T I H G M A G C G K  
CAGAGGCCAGTTGTTTGTGACAAAGGAAGTGGTGAATGCAATTCAGCAGAAGCTCCTCAAAATGAAAGGTGAACCAGGATGGGTCACCATACATGGAATGGCAGGCTGTGGGAAG

161 S V L A A E A V R D H S L L E G C F P P G G V H W V S V G K Q D K S G L L M K L Q  
TCTGATTAGTCGAGAAGTGTAGAGATCATCCCTTTTAGAAGTGTGTTCCACGGGGAGTGCAATGGGTTTTCAGTTGGGAAACAGAACAACTCTGGGCTTCTGATGAACTGCAG

201 N L C T R L D Q D E S F S Q R L P L N I E E A K D R L R I L M L R K H P R S G L L  
AATCTTTGCACACGGTTGGATCAGGATGAGAGTTTTTCCAGAGGCTTCCACTTAATATGAGAGGGCTAAAAGACCGTCTCCGATTCTGATGCTTCGCAACACCCAAAGTCTCTCTTG

241 I L D D V W D S V V L K A F D S Q C Q I L L T T R D K S V T D S V M G P K Y V V  
ATCTTGGATGATGTTGGGACTCTGGGTTGAAAGCTTTGACAGTCAGTGTCAAGTTCTTCTTACAAACCAGAGACAGAGTGTTACAGATTGATTAAGGGTCTCAATAATGTTAGTGC

281 P V E S S L G K E K G L E I L S L F V N M K K A D L P E Q A H S I I K E C K G S  
CCTGAGGAGATTCTTAGAAAAGAAAAAGGACTTGAATTTTTATCCCTTTTGTAAATAGAAAGGGCAGATTGCCAGAACAGCTCATAGTATTATAAAAGAAATGTAAGAGCTCT

321 P L V L S I G A L L R D F P P N R W E Y Y L K Q L Q N K Q F K R I R K S S Y D  
CCCTTTGATATCTTTAAATGGTGCACCTTTTACGTTGATTTCCTCAATCGCTGGAGTACTCCTCAAACAGCTTCAGAAATAAGCAGTTTTAAGAGAATAAGGAAATCTCTGTTATGAT

361 Y E A L D E A M S I S V E M L R E D I K D Y Y T D L S I L Q K D V K V P T K V L  
TATGAGGCTCTAGATGAAGCCATGCTATAAGTGTGAAATGCTCAGAGAAGACATCAAGATATTATACACAGATCTTCCATCTCCTCAGAAGGACGTTAAGGTGCCTACAAAGGTGTTA

401 C I L W D M E T E E V E D I L Q E F V N K S L L F C D R N G K S F R Y Y L H D L  
TGTATTCTCTGGGACATGAAAACGTAAGAAGTTGAAGACATATGCAGAGGATTGTTAAATAAGTCTCTTTTATTCTGTGATCGGAATGGAAGTCTTTTTCGTTATTTTACATGATCTT

441 Q V D F L T E K N C S Q L Q D L H K K I I T Q F Q R Y H Q P H T L S P D Q E D C  
CAAGTAGATTTTTCTACAGAGAAGATTGCAGCCAGCTTCAAGATCTACATAAGAAGATAATCAGTTTCAGAGATACACCAGCCGCACTTTCCACAGATCAGGAAGCAGAGTGT

481 M Y W Y N F L A Y H M A S A K M H K E L C A L M F S L D W I K A K T E L V G P A  
ATGTATTGGTACAATTTCTGGCCATCAGATGGCCAGTGCAGAAGATGCAAGGAACTTTGTGCTTAATGTTTTCCCTGGATGGATTAAGCAAAAACAGAACTGTGAGGCTTGTCT

521 H L I H E F V E Y R H I L D E K D C A V S E N F Q E F L S L N G H L L G R Q P P  
CATCTGATTGATGAAATTTGTGGAATAACAGACATACTAGATGAAAAGGATTTGACAGTCAGTGAGAAATTTTCAGGAGTTTTATCTTTAATGGACACCCTTTTGGACAGCAGCTATT

561 P N I V Q L G L C E P E T S E V Y Q Q A K L Q A K Q E V D N G M L Y L E W I N K  
CCTAATATTGACAACGCTGGTCTCTGTGAGCCGAAAACCTTCAGAAGTTTATCAGCAAGCTAAGCTCGAGGCCAAGCAGGAGTTCGATAATGGAATGCTTTTACCTGGAATGGATAAACA

601 K N I T N L S R L V V R P H T D A V Y H A C F S E D G Q R I A S C G D K T L Q  
AAAAACATCAGAACTTTCCCGCTTAGTTGTCGCGCCACCACAGATGCTGTTTACCATGCCTGCTTTTCTGAGGATGGTCAGAGAATAGCTTCTGTGGAGCTGATAAAAACCTTACAG

641 V F K A E T G E K L L E I K A H E D E V L L C C A F S T D D R F I A T C S V D K K  
GTGTTCAAAGCAGGAGAGAACTTCTAGAAATCAAGCTCCTAGGATGAAAGTCTTTGTTGCAATCTCTACAGATGACAGATTTATGCAACCTGCTCAGTGGATGATAAAAA

681 V K I W N S M T G E L V H T Y D E H S E Q V N C H F T N S S H L L L A T G S  
GTGAGATTTGAAATTTCTAGCTGGGAACTAGTACACACTATGATGAGCACTCAGAGCAAGTCAATGCTGCCATTCCACAACAGTGTGATCATCTTCTCTTAGCCACTGGGTC

721 S D C F L K L W D L N Q K E C R N T M F G H T N S V N H C R F S P D D K L L A S  
AGTGACTGCTTCTCAAACTTGGGATTTGAATCAAAAAGAATGTCGAAATACCAATGTTTGGTGCATCAAAATTCAGTCAATCAGTGCAGATTTTCACCCAGATGATAAGCTTTTGGCTAGT

761 C S A D G T L K L W D A T S A N E R K S I N V K Q F F L N L E D P Q E D M E V I  
TGTTCAGCTGAGGAACCTTAAAGCTTTGGGATGCGCAGATCAGCAAAATGAGAGGAAAAGCATTAAATGTGAAAACAGTTCTTCTAAATTTGGAGGACCTCAAGAGGATAATGGAATGATA

801 V K C C S A D G A R I M V A A K N K I F L F D I H T S G L G E I H T G H  
GTGAAGTGTGTTGCTGCTGCTGATGGTGAAGATAATGGTGGCAGCAAAAATAAAATCTTTCTTTTTGACATTCATACTAGTGGCCTATTGGGAGAAATCCACACGGGCCATCAC

841 S T I Q Y C D F S P Q N H L A V V A L S Q Y C V E L W N T D S R S K V A D D C R G  
AGCACCATCCAGTACTGACTTCTCCCAAAAACATTTGGCAGTGGTGTCTTTTCCAGTACTGTGATAGTGTGGAATACAGACTCACCTCAAAGGTGGTGGTGTGCAGAGGA

881 H L S W V H G V M F S P D G S S F L T S S D D Q T I R L W E T K K V C K N S A V  
CATTAAAGTGGGTTTCAATGTTGATGTTTCTCCTGATGGATCATTATTTTGACATCTCTGATGACCAAGCAATCAGGCTCTGGGAGACAAAAGAAATGATAAGAACTCTGCTGTA

921 M L A K Q A G E V A D T V F Q E N E V M V L A V D H I R R L Q L I N G R T A G G Q I D Y L T  
ATGTTAAAGCAAGATGATGTTGTTCAAGAAAATGAAAGTGTGCTTGCAGTTGACATATAAGACAGTCTGCAACTCATTAAATGGAAGAACAGGTCAGATGATGATGATG

961 E A Q V S C C C L S P H L Q Y I A F G D E N G A I E I L E L V N N R I F Q S R F  
GAAAGCTCAAGTAGTCTGCTGCTTAAAGTCCACATCTTCAAGTATGCAATTTGGAGATGAAAATGGAGCCATTGAGATTTAGAACCTGTAACAATAGAAATCTCCAGTCCAGGTTT

1001 Q H K K A K T V W H I Q F T A D E K E K T L I S S S D D A E I Q V W N W Q L D K C I F L  
CAGCACAGAAAAGTATGGCAGATCCAGTTCCAGCCGATGAGAAGACTTTATTTCAAGTTCTGATGATGTAATTCAGGATGGAATTTGGCAATTTGGCAAAATGATATCTTTCTA

1041 R G H Q Q E T V K D F R L L K N S R L L S W S F D G T V K V W N I I T G N K E K D  
CGAGCCATCAGGAAACAGTGAAGACTTTAGACTCTTGAAAAATCAAGACTGCTTTCTTGCTCATTTGATGAACAGTGAAGGTATGGAATATTACTGGAAAATAAGAAAAGAC

1081 F V C H Q G T V L S C D I S H D A T K F S S T S A D K T A K I H L L L P L  
TTTGCTGTCACAGGTTACAGTACTTTCTTGACATTTCTCAGATGTACCAAGTTTTCATCTACCTCTGCTGACAAGACTGCAAAAGTCTGAGATTTTGATCTCTTTTGGCACTT

1121 H E L R G H N G C V R C S A F S V D S T L L A T G D D N G E I R I W N V S N G E  
CATGAAATGAGGGCCACACGGCTGTGCGCTGCTCTCTGTCAGGACCTCCTGGCAACGGGAGTGAACAATGGAGAATCAGGATATGGAATGCTCAAAACGGTGAG

1161 L L H L C A P L S E E G A A T H G G W V T D L C F S P D G K M L I S A G G Y I K  
CTCTTTCATTGTTGCTCCGCTTTCAAGAGAAGGAGTCTACCCATGGAGGCTGGTGTAGTACCTTTGCTTTTCCAGATGGCAAAATGCTTATCTGCTGGAGGATATATTAAG

1201 W W N V V T G E S S Q T F Y C T N G T N L L K K I H V S P D F K T Y V T V D N L G I  
TGGTGAACGTTGTCACTGGGAACTCTACAGACTTCTACAAAATGGAACAATCTTAAAGAAATACACAGTCCCTGACTTCAAAAACATATGTGATCTGAGGATAATCTGATG

1241 L Y I L Q T L E #  
TTATATATTACAGACTTTAGAATAA

Figura 28. Seqüència del gen d'Apaf-1-XL i corresponent seqüència peptídica. Els colors emprats a aquesta darrera corresponen als emprats a la Figura 1.

## 2.2. Clonació dels dominis CARD-NOD/CED4 i WDR en vectors d'expressió bacteriana.

Per a l'obtenció d'aquestes construccions es va partir d'un plasmidi que contenia el gen d'Apaf-1-XL clonat al vector d'expressió eucariota pcDNA3, el qual va ser facilitat pel laboratori del Dr. E. Pérez Payá. Per a la clonació i expressió en bacteri,

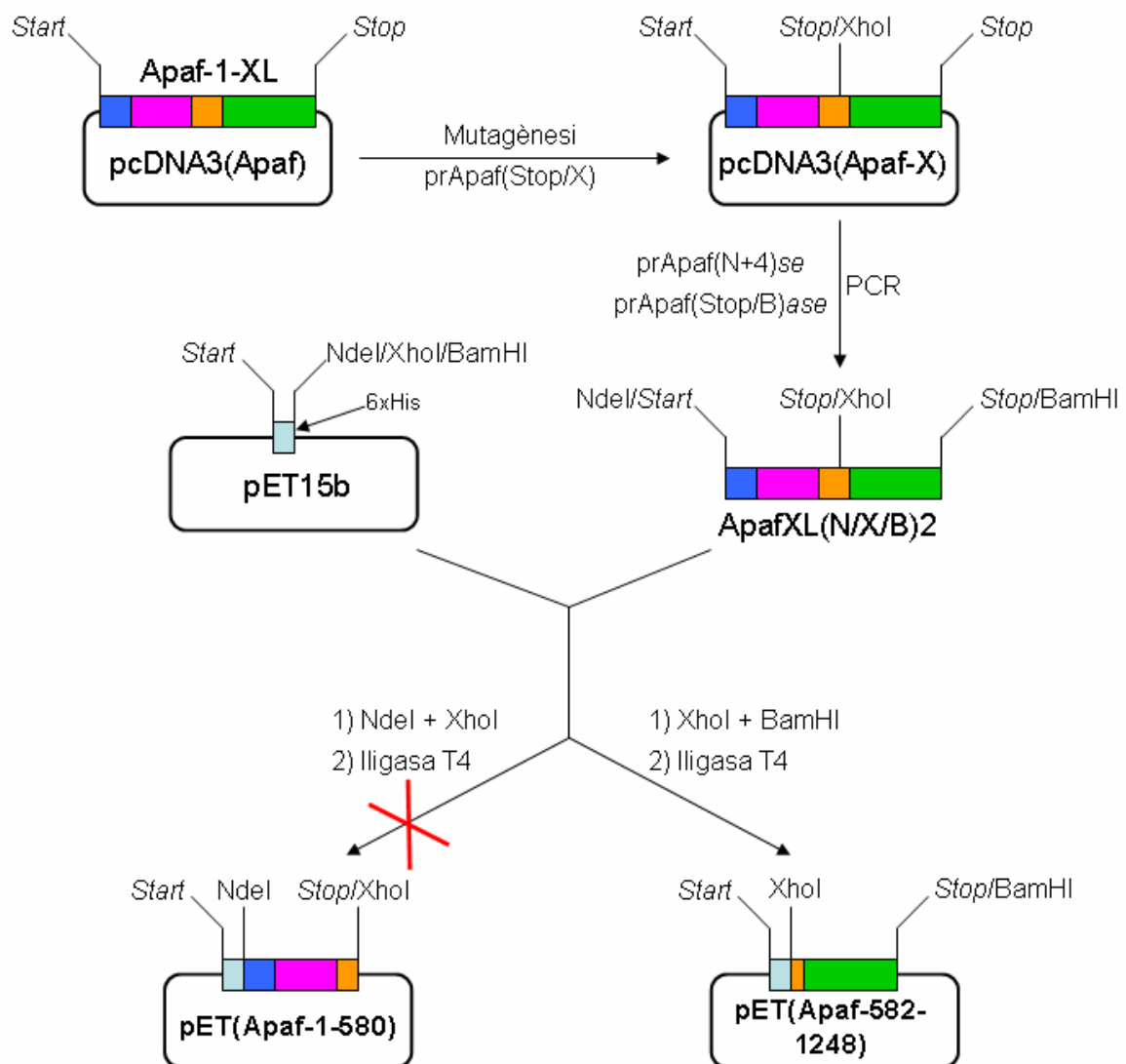
inicialment es va decidir emprar el vector pET15b, el qual introdueix un fragment d'uns 20 residus (segons les dianes de restricció emprades durant la clonació) a l'extrem *N*-terminal de les proteïnes que s'expressen. Dintre d'aquest fragment es troba una seqüència de 6 histidines que facilitaria la posterior purificació de la proteïna per cromatografia d'afinitat. A més presenta una diana per trombina que permetria la seva escissió, si fos necessària. També cal destacar que el gen es troba sota control del promotor induïble *lacT7*, que permet regular l'expressió de la proteïna d'interès mitjançant la inducció amb IPTG, i que permet la selecció per addició d'ampicil·lina o neomicina. Finalment, la clonació a aquest vector requeria la inserció de les dianes NdeI, XhoI o BamHI a posicions adients de la seqüència d'Apaf-1-XL.

En analitzar la seqüència del gen d'Apaf-1-XL (Figura 28) es va decidir emprar una estratègia de clonatge basada en la introducció per mutagènesi dirigida de dianes NdeI i BamHI als extrems 5' i 3' de la seqüència del gen. Per altra banda, donat que els antecedents anteriorment esmentats suggerien que la funció de les construccions *N* i *C*-terminals no depenia de forma molt important de la localització del punt de tall a la seqüència d'Apaf-1, sempre i quan aquest es trobés en la regió del *linker*, es va decidir introduir també un codó de *stop* seguit d'una diana XhoI entre les posicions 1741-1749 del gen d'Apaf-1-XL, de manera que en clonar el fragment NdeI – XhoI s'hauria d'obtenir la seqüència codificant dels residus 1-580, mentre que en clonar el fragment XhoI – BamHI s'obtindria la seqüència codificant dels residus 582 – 1248 de la proteïna.

D'acord amb això, mitjançant un protocol convencional de mutagènesi dirigida es va obtenir el plasmidi pcDNA3(Apaf-X) que incorporava el gen d'Apaf-1-XL amb el codó de *stop* i la diana XhoI. A partir d'aquest, mitjançant una reacció de PCR per amplificar el gen d'Apaf-1, emprant dos encebadors que contenien les mutacions adequades per introduir les dianes NdeI i BamHI als seus extrems 5' i 3', es va obtenir el fragment ApafXL(N/X/B)2, que conté el gen d'Apaf-1-XL modificat amb el codó de *stop* i la diana XhoI addicionals, així com una diana NdeI just abans del codó d'inici i una diana BamHI després del segon codó de *stop* (Figura 29).

Diferents intents per tal de clonar els fragments obtinguts per digestió d'ApafXL(N/X/B)2 amb NdeI-XhoI o XhoI-BamHI al vector pET15b van resultar sense èxit. Això es va atribuir en part a la inestabilitat de l'ADN durant les manipulacions per purificar-lo (*i.e.* desfosforilació no desitjada dels extrems cohesius), la baixa eficiència de les reaccions de lligació, i les dificultats derivades de transformar les soques JM109 o Sure d'*E.coli* amb plasmidis que contenen seqüències d'ADN

eucariota riques en fragments repetitius o inestables (Trinh, 1994). Per aquest motiu va ser necessari minimitzar la manipulació de les mostres un cop realitzades les digestions amb els enzims de restricció i emprar una soca d'*E. coli*, la Stbl2, adequada per a la clonació d'insercions inestables o repetitives, com era el cas de la seqüència corresponent al domini WDR de l'Apaf-1-XL, i que havia estat emprada prèviament per a la clonació de diverses construccions d'Apaf-1 (Benedict, 2000; Malet, 2004). D'aquesta manera es va aconseguir obtenir la construcció pET(Apaf-582-1248), no obstant, els intents per obtenir la construcció pET(Apaf-1-580) van resultar infructuosos.



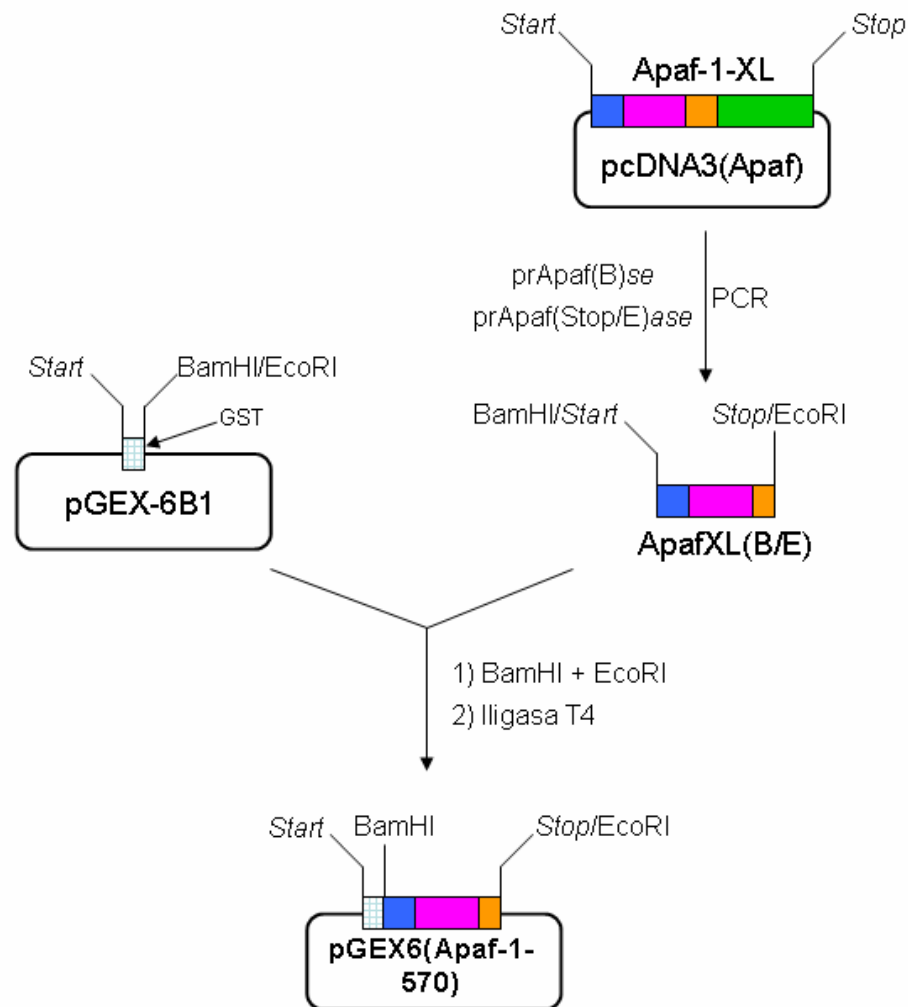
**Figura 29.** Estratègia emprada per a l'obtenció dels plasmidis pET(Apaf-1-580) i pET(Apaf-582-1248).

Degut als problemes esmentats i al fet que, com es veurà més endavant, l'expressió de la construcció pET(Apaf-582-1248) va tenir lloc en forma de cossos d'inclusió, a

partir dels quals l'obtenció de proteïna soluble i funcional va resultar tediosa i problemàtica, es va decidir emprar una estratègia alternativa de clonatge per a la construcció corresponent als dominis CARD-NOD/CED4 emprant el vector pGEX-6P1.

Els vectors pGEX permeten l'expressió a *E.coli* de proteïnes de fusió amb glutatió-S-transferasa (GST), que en el cas de pGEX-6P1 s'addiciona a l'extrem *N*-terminal de la proteïna d'interès. Aquesta pot actuar com una xaperona creant un entorn que facilitaria el correcte plegament de la proteïna, minimitzant així la formació de cossos d'inclusió. En aquest sentit, ja s'havia descrit a la literatura la clonació i expressió com a proteïnes de fusió a GST, del domini CARD i d'altres construccions derivades d'Apaf-1-S (Zhou, 1999; Day, 1999; Adrain, 1999). L'expressió al sistema pGEX està sota control del promotor *tac*, que és induïble per IPTG. Aquests vectors contenen igualment el gen *lacI<sup>q</sup>*. El producte d'aquest és una proteïna repressora que s'uneix a la regió operadora del promotor *tac*, impedint l'expressió fins el moment de la inducció amb IPTG, el que permet dur a terme un estricte control sobre l'expressió de l'ADN clonat. D'altra banda, el vector pGEX-6P1 conté una diana per a l'enzim *PreScission Protease* (Amesham Biosciences), proteïna de fusió de GST i la proteasa de Rhinovirus humà tipus 14 3C que reconeix específicament la seqüència d'aminoàcids Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro, tallant entre els residus de Gln i Gly. Donat que aquesta proteasa es activa inclús a baixa temperatura, es pot dur a terme la eliminació de la GST de la proteïna d'interès fent la digestió a 5°C, el que minimitza la degradació de la proteïna d'interès. Addicionalment la *PreScission Protease* és una proteïna de fusió també amb GST, el que permet una senzilla separació de la mescla de reacció un cop finalitzada la digestió.

Donat que les dianes de restricció disponibles en pGEX-6P1 no són les mateixes que les que es troben a pET15b, va ser necessari dur a terme de nou una etapa de mutagènesi per introduir les dianes adequades a la seqüència d'Apaf-1-XL. Així, es va decidir abordar el clonatge del fragment comprès entre els residus 1-570, que havia estat prèviament reportat a la literatura (Hu, 1998a, 1999), entre les dianes BamHI i EcoRI del vector pGEX-6P1. La seqüència d'Apaf-1-XL conté també una diana EcoRI, però a una posició posterior a on es volia introduir la nova, i per tant no afectava l'expressió del fragment *N*-terminal d'interès. D'acord amb això, emprant un esquema de clonatge similar a l'emprat anteriorment (Figura 30), es va obtenir el plasmidi pGEX6(1-570), que conté els dos dominis d'interès, CARD i NOD/CED4, de la seqüència d'Apaf-1-XL.



**Figura 30.** Estratègia emprada per a l'obtenció del plasmidi pGEX6(Apaf-1-570).

### 2.3. Obtenció de les variants truncades derivades d'Apaf-1-XL.

#### 2.3.1. Purificació de proteïnes expressades com a cossos d'inclusió.

En general, l'obtenció de proteïnes recombinants en forma soluble i biològicament activa emprant sistemes d'expressió en *E.coli*, representa encara un problema no resolt (Carrió, 2002). En molts casos, els alts nivells d'expressió que s'assoleixen amb aquests sistemes porten a l'acumulació d'agregats insolubles de proteïna inactiva, anomenats cossos d'inclusió. S'han assajat diferents mètodes per tal de maximitzar l'expressió en forma soluble de la proteïna, com per exemple controlant certs paràmetres de creixement del cultiu cel·lular per tal d'alentir l'expressió. Així, es pot disminuir la temperatura de creixement de 37 °C fins a 20 °C-30 °C, o alterar les condicions d'inducció (Garcia-Junceda, 1995; Saxena, 1996; Sprague, 2000; Bjorndal, 2003). En general, la inducció a baixes densitats cel·lulars del cultiu ( $OD_{600}=0,5$ ),

resulta en més alts rendiments de l'expressió de la proteïna en forma soluble. No obstant, en alguns casos, resulta beneficiós créixer les cèl·lules fins a una densitat més elevada ( $OD_{600} > 1$ ), i dur a terme una inducció més curta o disminuir la concentració d'IPTG emprada per a la inducció. D'aquesta manera el rendiment de l'expressió pot ser inferior, però augmenta l'expressió de la proteïna en forma soluble. No obstant, l'expressió en forma de cossos d'inclusió presenta certs avantatges. D'una banda, els nivells d'expressió poden ser molt alts i les proteïnes que constitueixen aquests agregats estan protegides front la degradació proteolítica pels enzims de la cèl·lula hoste. D'altra banda, els cossos d'inclusió poden ser fàcilment separats de la resta de proteïnes solubles de la cèl·lula per centrifugació, reduint el nombre d'etapes de separació requerides durant la purificació del producte desitjat. Addicionalment, si el producte d'expressió és tòxic per a la cèl·lula hoste, la formació dels cossos d'inclusió inactius pot incrementar la viabilitat de les cèl·lules, i per tant el rendiment de l'expressió de la proteïna d'interès.

El desavantatge principal de l'expressió de proteïnes heteròlogues en forma de cossos d'inclusió és la recuperació de la proteïna soluble, correctament plegada i activa, a partir dels agregats de proteïna inactiva i insoluble (Li et al., 2004). Generalment, un primer pas consisteix en la solubilització dels agregats de proteïna en un tampó que contingui agents caotròpics per a continuació procedir al plegament *in vitro* de la proteïna (Mukhopadhyay, 1997; de Bernardez Clark, 1999). Els agents emprats habitualment per a la solubilització són urea 6-8 M, el clorur de guanidini 6-7 M, i detergents iònics forts (Tsumoto, 2003). Igualment, els cossos d'inclusió solen contenir enllaços disulfur, que redueixen la solubilitat en absència d'agents reductors com el ditiotretol (DTT), ditioeritrol (DTE) o 2-mercaptoetanol. L'addició d'aquests tiols en combinació amb els agents caotròpics permet la reducció dels enllaços disulfur per bescanvi del tiol que forma l'enllaç disulfur (Mukhopadhyay, 1997; de Bernardez Clark, 1999). El plegament de les proteïnes ve determinat per un equilibri entre les estructures plegades, rígides i compactes, i la flexibilitat de les estructures desplegadas. El plegament en una estructura correcta competeix amb el plegament incorrecte i l'agregació. Per manipular aquest equilibri s'ha tenir en compte la forma en que els agents desnaturalitzants són eliminats del medi i el temps que els intermediaris de plegament estan exposats a concentracions intermitges d'aquells. Existeixen tres estratègies principals per abordar el procés de renaturalització. D'una banda el model de dilució de la proteïna solubilitzada directament al tampó de renaturalització. En aquest cas es tracta de controlar la concentració de la proteïna

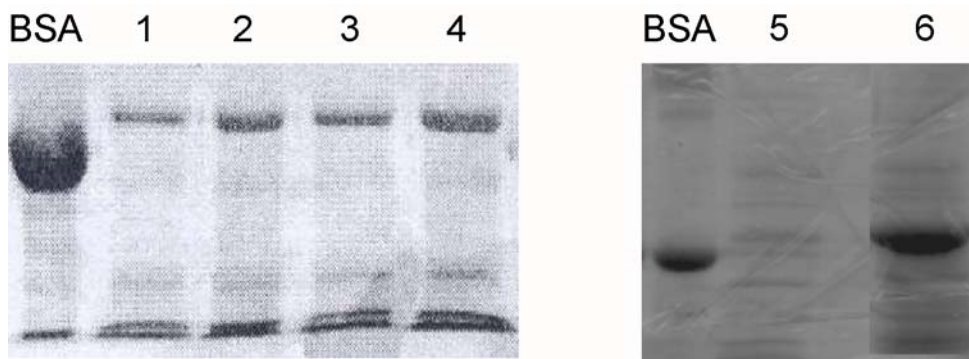


per prevenir-ne l'agregació. Una altra possibilitat és el bescanvi de dissolvent per diàlisi o cromatografia d'exclusió molecular. Finalment, una tercera aproximació seria l'adsorció reversible de la proteïna desnaturalitzada a un suport sòlid, per exemple un suport cromatogràfic, i posterior eliminació de l'agent desnaturalitzant. D'aquesta manera s'impedeix la difusió d'unes molècules cap a d'altres quan es troben parcialment plegades i es dificulta l'agregació. Aquesta estratègia es útil quan la proteïna desitjada s'expressa amb una cua d'His, la qual manté la seva capacitat d'unió als cations metàl·lics presents als suports emprats per cromatografia d'afinitat en presència d'agents desnaturalitzants (Li et al., 2004). Igualment, es poden addicionar petites molècules, anomenades xaperones químiques, capaces de facilitar el plegament, en estabilitzar les proteïnes o augmentar-ne la solubilitat (Tsumoto et al., 2003). Entre aquests reactius es troben la L-Arg, el polietilenglicol, o inclús anticossos monoclonals (Nygren et al., 1994). Alternativament la proteïna pot dissenyar-se per tal de facilitar el plegament. En aquest sentit, en certes ocasions es pot afavorir l'expressió en forma soluble fusionant la proteïna amb tendència a l'agregació a una proteïna soluble, com la glutatió S-transferasa (GST), la proteïna d'unió a maltosa (MBP) o la tioredoxina (TRX). La presència de la proteïna soluble, segrestaria els intermediaris de plegament de la proteïna d'interès, impeding-ne la seva interacció i per tant la formació d'agregats, i facilitant l'adopció de la conformació nativa. La MBP s'ha mostrat com la més efectiva en aquest sentit (Kapust, 1999; Braun, 2002), no obstant, la purificació emprant un sistema basat en la GST és més eficaç, donada l'elevada afinitat de la GST pel glutatió (Nygren, 1994).

### **2.3.2. Obtenció d'Apaf-1-XL(582-1248).**

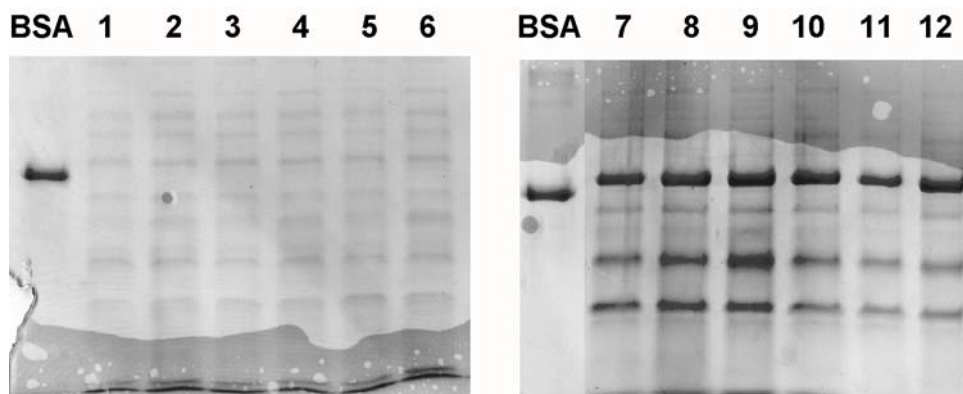
Per a l'obtenció de la proteïna recombinant Apaf-1-XL-(583-1248), es van fer cultius en la soca d'*E.coli* BL21(DE3), emprada a la literatura per a l'expressió de diverses construccions d'Apaf-1 (Srinivasula, 1998; Qin, 1999; Lauber, 2001; Zou 1997). Inicialment, es van fer proves d'expressió emprant diferents temperatures (30 o 37 °C) i temps d'inducció (2 o 4 hrs). En analitzar alíquotes dels cultius cel·lulars per electroforesi, es va detectar una banda de proteïna sobreexpressada amb un desplaçament electroforètic lleugerament menor que el de la BSA emprada com a patró (67 KDa), que era compatible amb la mida esperada (77,5 KDa) per a la construcció Apaf-1-XL(582-1248) amb la fusió de 21 residus provinents del vector pET15b. No obstant, no es van observar diferències substancials als nivells d'expressió entre unes condicions i les altres (Figura 31). A més, en dur a terme la lisi

cel·lular i fer la separació de les fraccions soluble i insoluble, es va confirmar que la proteïna d'interès s'expressava en tots els casos en forma de cossos d'inclusió, donat que només es trobava a la fracció insoluble (Figura 31).



**Figura 31.** Esquerra: Electroforesi SDS-PAGE d'aliquotes de cultius cel·lulars d'*E.coli* BL21(DE3) transformats amb pET(Apaf-582-1248), i induïts amb IPTG 1 mM a temperatures de 37 °C (1 i 3) o 30 °C (2 i 4) i durant 2 h (1 i 2) o 4 h (3 i 4). Dreta: Electroforesi SDS-Page d'aliquotes corresponents a la fracció soluble (5) i insoluble (6), provinents del lisat d'un cultiu d'*E.coli* BL21(DE3), transformat amb pET(Apaf-582-1248) i induït amb IPTG 1 mM a 37 °C durant 2 h. La BSA es va emprar com a referència de pes molecular (67 KDa).

Es van fer assaigs addicionals per intentar expressar la proteïna en forma soluble reduint la concentració d'inductor i la temperatura a la que es realitzava l'expressió. No obstant, tal com mostra la Figura 32, els resultats van ser els mateixos: la banda de proteïna sobreexpressada es trobava sempre a la fracció insoluble.



**Figura 32.** Electroforesi SDS-PAGE d'aliquotes de les fraccions soluble (1-6) i insoluble (7-12) provinents de cultius d'*E.coli* BL21(DE3) transformats amb pET(582-1248) i induïts a 25 °C durant 2 h amb IPTG 0,05 mM (1, 7), 0,1 mM (2, 8), 0,3 mM (3, 9), 0,5 mM (4, 10), 0,7 mM (5, 11), i 1 mM (6, 12). La BSA es va emprar com a referència de pes molecular (67 KDa).

Davant l'aparent impossibilitat d'obtenir la proteïna en forma soluble, i donat que l'anàlisi de la fracció insoluble indicava la presència d'altres components a més de la

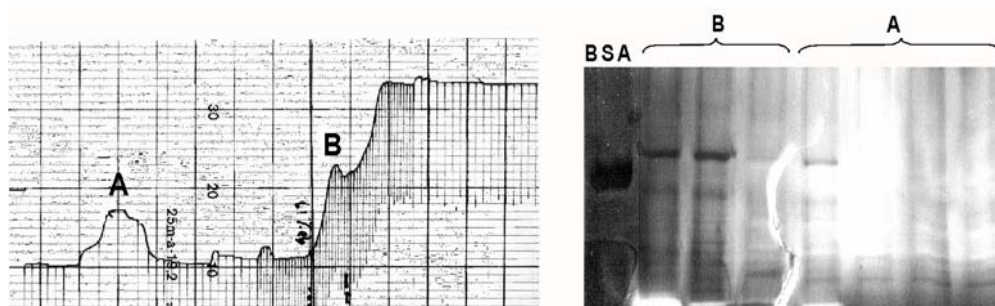
banda d'interès, es va decidir abordar un procediment de purificació basat en la solubilització per efecte d'agents desnaturalitzants, cromatografia d'afinitat i posterior renaturalització de la proteïna.

Es van fer diferents assaigs per tal de determinar les millors condicions per solubilitzar les fraccions insolubles i dur a terme la cromatografia d'afinitat. Així es van provar diferents composicions dels tampons (Tris-HCl o PBS), amb o sense detergent (Triton X-100) i amb diferents agents caotròpics (hidroclorur de guanidini o urea), per aconseguir la solubilització. Els millors resultats en quant a la solubilització de la major part de les fraccions insolubles es van obtenir emprant tampó PBS amb 6M d'urea. Amb aquestes solucions es van realitzar assaigs de purificació emprant una columna de Ni-sefarosa, que en principi només hauria de retenir les proteïnes capaces d'establir una forta interacció amb el metall, com era el cas de la nostra construcció que contenia una cua amb 6 histidines. L'elució es realitzava en condicions desnaturalitzants, emprant tampons PBS amb 6M d'urea que contenien una concentració creixent d'imidazole (5-700 mM). No obstant, en analitzar per electroforesi les fraccions eluïdes de la columna, es va observar que si bé la banda d'interès només es trobava a les fraccions corresponents a l'etapa d'elució (*i.e.* no a les corresponents a l'etapa de rentat), el qual indicava que la proteïna era retenguda tal com s'esperava, junt amb ella coeluien altres proteïnes, en general de menor pes molecular. Aquest resultat es reproduïa encara que es variessin les condicions d'elució emprant concentracions més elevades d'imidazole durant l'etapa de rentat o s'empressin gradients més suaus durant l'etapa d'elució, i també quan es van emprar diferents tipus de columna d'afinitat (HiTrap Chelating HP *vs.* HisTrap HP, ambdues d'Amersham Biosciences). Intents de separació mitjançant cromatografia de bescanvi aniònic van resultar també ineficaços per eliminar aquestes bandes de menor pes molecular.

Tot i que no es podia descartar la possibilitat que es produïssin interaccions inespecífiques entre la matriu de les columnes i components proteics d'origen bacterià que haguessin co-precipitat amb la proteïna d'interès i que no s'haguessin pogut eliminar prèviament amb els rentats de les fraccions insolubles, va semblar molt més probable que aquestes corresponguessin a fragments que contenien la cua de histidines, que s'haurien originat per degradació de la proteïna d'interès, o bé a proteïnes que interaccionessin fortament amb aquesta. En aquest sentit, cal destacar que el fragment 582-1249 derivat d'Apaf-1-XL conté 27 residus de cisteïna, els quals si la proteïna no es troba correctament plegada, podrien estar exposats i a l'abast

d'altres proteïnes presents a la matriu cel.lular amb les quals podrien formar unions covalents de tipus pont disulfur. Si aquest fos el cas, aquestes proteïnes contribuirien a la formació d'agregats insolubles i no es podrien separar de la proteïna d'interès a menys que s'empressin condicions reductores per tal de trencar aquestes unions.

D'acord amb això es va modificar el protocol emprat per dissoldre les fraccions insolubles separades després de fer la lisi cel.lular, de manera que al tampó PBS amb 6 M d'urea s'hi va afegir 5 mM de DTT com a agent reductor que hauria de trencar els possibles ponts disulfur. Aquest reductor es va mantenir al llarg de tot el procés cromatogràfic amb la columna d'afinitat. La Figura 33 mostra el perfil cromatogràfic obtingut en aquestes condicions, així com l'anàlisi per electroforesi de les fraccions corresponents als dos pics principals que se separen durant la cromatografia.

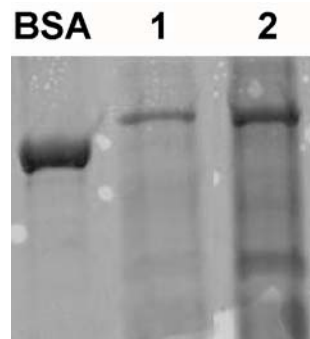


**Figura 33.** Cromatograma enregistrat ( $Abs^{280}$ ) durant la purificació per cromatografia d'afinitat d'una dissolució de la proteïna Apaf-1-XL(583-1248) emprant tampons que contenen urea 6 M i DTT 5 mM i anàlisi per electroforesi SDS-PAGE de les fraccions corresponents a les etapes de rentat (A) i d'elució (B). La BSA es va emprar com a referència de pes molecular (67 KDa).

Com es pot observar, les fraccions recollides durant l'etapa de rentat no contenen gairebé gens de la banda d'interès, mentre que les que es van recollir durant la etapa d'elució presenten com a banda més intensa l'atribuïda a la proteïna d'interès. Intentos addicionals de purificació d'aquestes fraccions per cromatografia d'exclusió molecular emprant columnes empaquetades amb Superdex 200, que presenta un marge òptim de separació per a proteïnes entre 10 i 600 KDa, no van contribuir a millorar sensiblement la puresa de la banda esmentada.

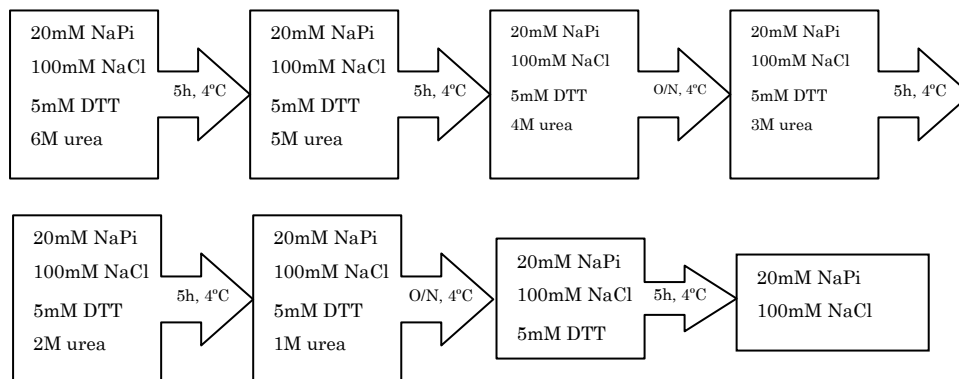
Tot i que la proteïna obtinguda no era completament pura, es va continuar endavant amb el procés de renaturalització. Amb aquest objectiu es va assajar un protocol de diàlisi per tal d'anar eliminant progressivament l'agent desnaturalitzant i permetre la renaturalització lenta de la proteïna. Assaigs realitzats en els que es passava del tampó amb 6 M d'urea a tampó sense urea en només 2-3 etapes de diàlisi, en presència o no d'arginina (500 mM), aminoàcid que afavoreix el plegament i la

solubilització de proteïnes expressades en forma insoluble (de Bernardez Clark, 1999), van donar lloc al repartiment de la proteïna d'interès entre una fracció soluble i una fracció insoluble (Figura 34).



**Figura 34.** Electroforesi SDS-PAGE de les fraccions soluble (1) i insoluble (2) obtingudes després d'eliminar completament l'agent desnaturalitzant, provenint de l'etapa de cromatografia d'afinitat, per diàlisi contra PBS.

Les millors condicions per recuperar la major part de la proteïna a la fracció soluble es van obtenir en realitzar una disminució de la concentració d'urea de forma molt gradual, emprant un elevat nombre d'etapes de diàlisi, tal com s'esquematitza a la Figura 35.



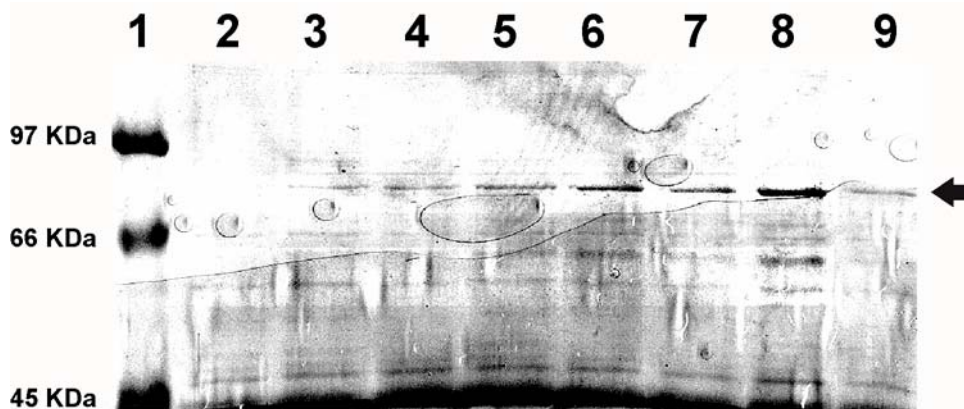
**Figura 35.** Esquema de diàlisi emprat per reduir lentament la concentració d'urea de les mostres provenints de l'etapa de purificació per cromatografia d'afinitat.

La migració lenta des de condicions desnaturalitzants fins a condicions que es poden considerar properes a les fisiològiques, afavoriria el plegament correcte de la proteïna, donant-li prou temps per anar adoptant la conformació nativa. Les condicions reductores es van mantenir fins a la darrera etapa, en que idealment la proteïna ja hauria arribat a adoptar aquesta conformació, de manera que s'afavoriria

la formació de ponts disulfur intramoleculars que estabilitzarien aquesta conformació, enfront dels intermoleculars que afavoririen la formació d'agregats insolubles.

### 2.3.3. Obtenció d'Apaf-1-XL(1-570).

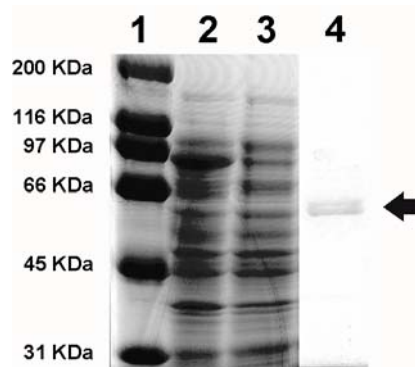
Tal com s'havia fet en el cas de la construcció *C*-terminal, en primer lloc es van determinar les condicions d'inducció i expressió que permetien maximitzar l'obtenció de la proteïna en forma soluble. Amb aquest objectiu es van realitzar cultius de cèl.lules d'*E. coli* BL21(DE3) que havien estat transformades amb pGEX6(Apaf-1-570), i es van induir emprant diferents concentracions d'IPTG a 30 i 37 °C. L'anàlisi per electroforesi SDS-PAGE va mostrar l'aparició d'una banda principal entre els marcadors de pes moleculars de 66 i 97 KDa, que podia correspondre a la proteïna d'interès fusionada a GST (91 KDa) (Figura 36). Els majors nivells d'expressió es van observar per als cultius induïts amb 0,5 mM d'IPTG a 37 °C.



**Figura 36.** Electroforesi SDS-Page d'aliquotes dels pèllets cel.lulars obtinguts a partir de cultius d'*E.coli* BL21(DE3) transformats amb pGEX6(Apaf-1-570), i induïts a 30 °C (2-5) o 37 °C (6-9), amb IPTG 0,05 mM (2 i 6), 0,1 mM (3 i 7), 0,5 mM (4 i 8), o 1 mM (5 i 9). 1 correspon al marcador de pes molecular. La banda corresponent a la proteïna desitjada es destaca amb una fletxa.

Donat que en aquest cas la proteïna d'interès es trobava fusionada a GST, els lisats cel.lulars no es van sotmetre a condicions desnaturalitzants. No obstant, donat que, com abans, el fragment 1-570 clonat conte 14 residus de cisteïna i es podia esperar una tendència a l'agregació (Adrain, 1999), es van emprar tampons que contenien Tritó X-100 i DTT per tal de minimitzar la formació d'agregats. Tot i així es va poder constatar que una bona part de la proteïna es trobava a la fracció insoluble obtinguda dels lisats cel.lulars (Figura 37). La fracció soluble es va incubar amb glutatió-sefarosa a baixa temperatura per tal d'extreure la proteïna fusionada a GST. Un cop rentada, la resina es va tractar amb la proteasa (*PreScission protease*, Amersham

Biosciences) específica per a la diana introduïda, per tal de dur a terme l'alliberament de la proteïna d'interès de la fusió amb GST. A cada pas d'aquest procés de purificació es van extreure alíquotes que es van analitzar per electroforesi, per tal de fer el seguiment de la proteïna. Tal com mostra la Figura 37, finalment es va obtenir una solució que contenia majoritàriament una banda amb una mida aproximada d'uns 60 KDa que podia correspondre a la construcció Apaf-1-XL-(1-570) (65 KDa) desitjada. No obstant, intents realitzats per determinar la massa molecular de forma més acurada per ESI-MS o MALDI-TOF no van donar resultats, probablement degut a la poca quantitat de proteïna disponible per als experiments, així com a que en les condicions requerides per fer les anàlisis (absència de sals i tampons), és difícil que aquestes proteïnes es mantinguessin en solució. D'aquesta manera, les solucions de proteïna obtingudes es van emprar per realitzar els assaigs que es descriuen al capítol següent sense més manipulacions addicionals.

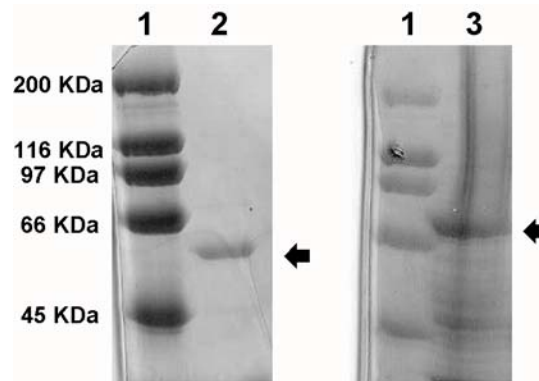


**Figura 37.** Electroforesi SDS-Page d'alíquotes del cultiu d'*E.coli* BL21(DE3) transformat amb pGEX6(Apaf-1-570) i induït durant 3 h a 37 °C amb 0,5 mM IPTG (2), de la fracció soluble obtinguda del lisat cel.lular (3) i de la solució de proteïna obtinguda al final del procés de purificació (4). 1 correspon al marcador de pes molecular. La banda corresponent a la proteïna desitjada es destaca amb una fletxa.

#### 2.3.4. Expressió i purificació de les construccions Apaf-1-XL(1-572) i Apaf-1-XL(570-1248).

En el transcurs del treball que es descriu als apartats anteriors es va establir contacte amb el Dr. A. G. Martín, del grup del Dr. Fearnhead (National Cancer Institute, Frederick, EUA), el qual ens va facilitar plasmidis que contenen dues construccions similars a les preparades segons s'ha descrit anteriorment. La primera d'aquestes construccions (pGEX4(Apaf-1-572)) comprenia els dominis CARD i NOD/CED-4 de l'Apaf-1-XL, igual que la descrita a l'apartat anterior, però en aquest cas corresponia al fragment 1- 572 en lloc del 1-570. La segona comprenia els residus

570-1248 (pGEX4(Apaf-570-1248)), corresponents al domini WDR de l'Apaf-1-XL. En aquest cas la diferència respecte la construcció *C*-terminal prèviament descrita (582-1248) era de 12 residus. Totes dues construccions estaven clonades al plasmidi pGEX-4T1, el qual, igual que el pGEX-6P1, permet dur a terme l'expressió induïda per IPTG a *E.coli* de la proteïna d'interès fusionada a GST a l'extrem *N*-terminal. La presència entre la GST i la proteïna subclonada d'una diana específica per trombina permet eliminar la GST un cop s'ha purificat la proteïna de fusió per afinitat.



**Figura 38.** Electroforesi SDS-PAGE de les solucions finals obtingudes després del procés de purificació dels lisats dels cultius d'*E. coli* BL21(DE3) transformats amb pGEX4(Apaf-1-572) (2) i pGEX4(Apaf-570-1248) (3). 1 correspon al marcador de pes molecular. Les bandes corresponents a les proteïnes desitjades es destaquen amb una fletxa.

Els cultius es van induir a 37 °C amb 0,5 mM d'IPTG, tal com s'havia fet amb els cultius transformats amb pGEX-6B1, i un cop lisats, la fracció soluble es va tractar amb la resina de glutatió-sefarosa per tal de recuperar les dues proteïnes fusionades a GST. Seguidament es va fer el tractament amb trombina per alliberar-les de la GST i les solucions resultants es van fer passar per una columna de benzamidina-sefarosa. La benzamidina és un inhibidor de proteases que uneix específicament la tripsina i altres serinproteases, de forma que permetia una eliminació senzilla de la trombina present al medi de reacció. La Figura 38 mostra el resultat de l'anàlisi de les solucions obtingudes al final d'aquest procés, les quals presenten en un cas una banda principal de proteïna amb una mida aproximada de 60 KDa i en l'altre d'uns 70 KDa, compatibles amb les mides esperades per a les construccions d'interès (65 KDa per l'Apaf-1-XL(1-572) i 76 KDa per l'Apaf-1-XL(570-1248)). No obstant, com ja havia passat amb la construcció anterior, els intents per determinar acuradament la massa molecular d'aquestes proteïnes per MALDI-TOF no va donar resultats. La mostra corresponent a la construcció Apaf-1-XL(570-1248) (3, Figura 38) presentava a més algunes bandes de mida inferior que, donat que la seva seqüència no presenta dianes



per trombina, es van atribuir a impureses provinents del cultiu, que no s'havien pogut eliminar amb la cromatografia d'afinitat. Tot i així no es van realitzar intents addicionals de purificació i les mostres es van emprar directament per realitzar els experiments que es descriuen al capítol següent.

#### 2.4. Discussió.

Els intents per obtenir les construccions *N* i *C*-terminals proposades, derivades d'Apaf-1-XL, van donar resultats en general poc satisfactoris, que eren de difícil previsió en base a les dades reportades a la literatura per diferents autors. Tal com s'ha esmentat a la Introducció d'aquest capítol, diversos treballs havien reportat l'obtenció de construccions similars emprant sistemes d'expressió basats en la soca d'*E. coli* BL21(DE3) i vectors pET i pGEX induïbles per IPTG (Zou, 1997; Srinivasula, 1998; Adrain, 1999; Lauber, 2001), similars als emprats per nosaltres. No obstant, en cap d'aquests treballs es feia esment de dificultats a l'hora d'expressar o purificar les esmentades construccions, i de fet els detalls que es donen sobre els protocols de purificació són molt limitats, sense esmentar en cap cas l'expressió en forma de cossos d'inclusió o la formació d'agregats durant les etapes de purificació. A les nostres mans, tal com s'ha descrit als apartats anteriors, aquest no va ser el cas. En aquest sentit, sí que hi hagut una certa controvèrsia a la literatura sobre els treballs publicats inicialment sobre la caracterització de les diferents isoformes d'Apaf-1 identificades, fent-se esment en algun cas de la impossibilitat de manipular la isoforma Apaf-1-S *in vitro* degut a la seva elevada insolubilitat (Benedict, 2000; Saleh, 1999). Aquesta isoforma, que després va ser qualificada com "inactiva", és la que es va descriure en primer lloc pel grup de X. Wang (Zou, 1997) com capaç de promoure l'activació de les procaspases-9 i -3 i desencadenar el procés d'apoptosi.

Contactes personals posteriors amb el Dr. G Núñez ens van fer assabentar que, en l'experiència d'aquest grup, un dels que ha treballat més intensament amb l'Apaf-1, l'expressió de construccions derivades d'aquesta proteïna en sistemes procariotes comporta habitualment la pèrdua de la seva funció, essent necessari emprar sistemes d'expressió eucariotes per tal de disposar de proteïnes funcionals. Contactes amb el Dr. A. M. Martín, qui ens va facilitar dues de les construccions derivades d'Apaf que es van preparar segons s'ha descrit en aquest capítol, també van ser en aquest sentit.

Un dels problemes més importants amb que ens hem trobat per a l'obtenció d'aquestes proteïnes ha estat la formació de cossos d'inclusió i agregats insolubles durant l'expressió i al llarg de les diverses etapes de purificació. La formació d'aquests

agregats pot originar-se per diferents causes, algunes de les quals s'han avançat ja al llarg d'aquest capítol. D'una banda, l'existència d'una proporció important de residus de cisteïna capaços de formar ponts disulfur intermoleculars si la proteïna no es troba plegada adequadament, pot ser una probable causa. L'existència d'un ambient reductor a l'interior d'*E. coli* podria afavorir que durant l'expressió de la proteïna aquests residus puguin trobar-se en forma reduïda i lliures per interaccionar amb residus d'altres unitats de la mateixa proteïna o d'altres que es trobin a la matriu cel·lular. Es pot racionalitzar que això, d'una banda dificultaria la formació de ponts disulfur intramoleculars, que a la proteïna nativa tindrien la funció d'estabilitzar la seva estructura, i augmentaria les possibilitats que es formessin altres enllaços de forma inespecífica. En aquest sentit, no obstant, cal assenyalar també que recentment s'ha reportat l'estructura cristal·logràfica de la construcció 1-591 derivada d'Apaf-1-XL (Riedl, 2005) i que a aquesta no s'observa l'existència de ponts disulfur intramoleculars. Tot i així, no es pot descartar que a la estructura de la proteïna sencera n'existeixin, en particular a la regió corresponent al domini WDR. Una segona raó probable per a la formació d'aquests agregats radicaria en la capacitat inherent d'autoassociació que presenta Apaf-1, i per extensió les construccions derivades d'aquesta. En aquest sentit, Adrain i col. havien demostrat la capacitat per dimeritzar, sense necessitat d'inducció, de construccions derivades d'Apaf-1 on s'havia eliminat el domini WDR (Adrain, 1999). Aquesta capacitat era major per a les construccions que conservaven intacte el domini NOD/CED4 i el *linker* que uneix aquest amb el WDR (residus 1-601 d'Apaf-1-S), si bé també es va detectar, encara que de forma més feble, a d'altres constituïdes només pel domini NOD/CED4 (residus 92-412 d'Apaf-1-S). Finalment, tot i que a les estructures cristal·logràfiques de construccions derivades d'Apaf reportades fins ara no s'han detectat modificacions post-traduccionals, no es pot descartar que a l'estructura de la proteïna nativa n'existeixin, i que l'absència d'aquestes a les construccions expressades a *E. coli* pugui donar peu a una major tendència a l'agregació.

Adicionalment, aquests problemes d'agregació van constituir la principal causa que s'obtinguessin baixos rendiments de proteïna soluble. En general, aquests rendiments van estar al voltant de 30 µg de proteïna per litre de medi de cultiu, el que és molt menys del que s'havia esperat obtenir i, ara com ara, fa difícil pensar que la producció a *E. coli* d'aquestes proteïnes pugui constituir una alternativa pràctica per a la realització d'assaigs de cribratge de molècules, front a la producció de la proteïna salvatge. És possible pensar a assajar sistemes alternatius d'expressió a bacteri que

puguin millorar els rendiments de proteïna soluble i funcional, no obstant les limitacions de temps van impedir abordar aquests estudis.



### 3. ASSAIGS IN VITRO D'ACTIVACIÓ DE CASPASES I INTERACCIÓ AMB APAF-1.

#### 3.1 Introducció.

El control de l'ensamblatge dels macrocomplexos implicats en l'activació de les caspases, com ara l'apoptosoma, resulta d'especial interès terapèutic. En aquest sentit, el pas inicial d'unió Cit c-Apaf-1 és crucial al procés de formació de l'apoptosoma actiu i per tant representa una potencial diana terapèutica.

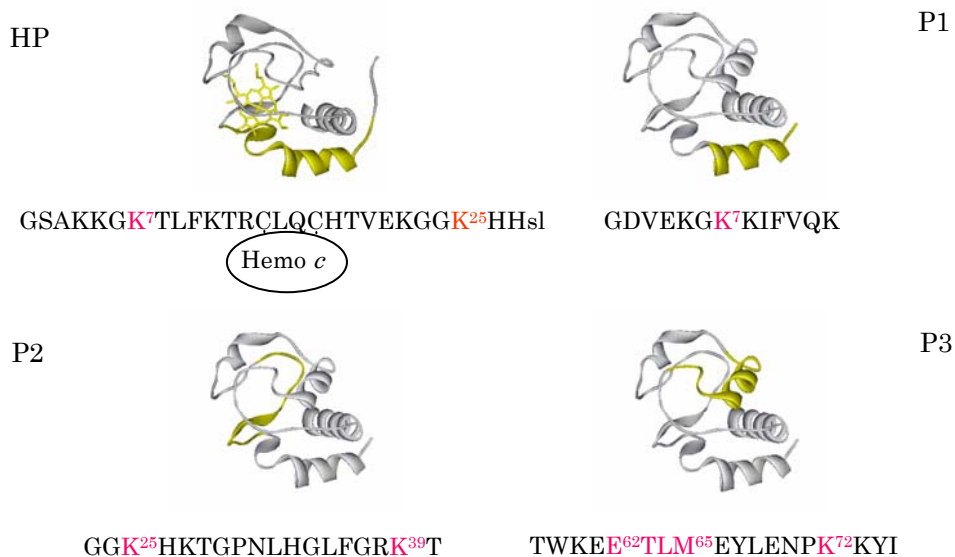
Tal com s'ha descrit als capítols anteriors, s'havien preparat un nombre de mutants de YCit c els quals contenien modificacions en la regió *N*-terminal de la proteïna, que s'esperava que la dotessin de capacitat per interaccionar amb Apaf-1. El disseny d'aquests citocroms mutants s'havia fet en base a un treball publicat pel grup del Dr. McLendon (Yu, 2001), en el que s'havien reportat les activitats proapoptòtiques de una col·lecció de 27 mutants de HHCit c i YCitc. En aquest treball s'havia determinat que els residus en posicions 7, 25, 39, 62-65 i 72 en la seqüència de HHCit c eren "claus" per a la seva activitat, i que la introducció en YCit c de les mutacions A7K, P25K, H39K, N62E, N63T, M64L, S65M, J72K\*, C102T i la deleció dels seus 5 primers residus, per tal d'apropar la seqüència de YCit c a la de HHCit c, dona lloc a una proteïna amb una potencia similar a HHCit c en quant a la seva activitat per induir l'activació de PC-3. D'altres mutants reportats en el mateix treball, que contenen només algunes de les mutacions anteriors són menys actius, si bé a elevada concentració els autors reporten activitat inclús pel mutant que només conté les modificacions J72K i C102T.

En el nostre cas, el mutant que contenia un major nombre de modificacions per apropar-lo a la seqüència de HHCit c era YCit c ( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M), que a més de la deleció dels 5 primers residus de la seqüència i les mutacions en posicions 7 i 25, contenia també la J72K i C102T, si bé aquestes darreres eren presents a totes les

---

\* J fa referència al residu de lisina trimetilat en el grup  $\epsilon$ -amino, que en expressar la proteïna en bacteri esdevé un residu de lisina no modificat.

construccions de YCit c expressades en bacteri. S'havia suggerit que l'efecte de la presència d'aquests residus "clau" en posicions 7, 25, 39, 62-65 i 72 tenia un caràcter additiu, per tant, la nostra hipòtesi de partida era que la introducció d'alguns d'aquests residus donaria lloc a citocroms parcialment actius, amb una certa capacitat per interaccionar amb Apaf-1. D'aquesta manera es pretenia determinar el grau de participació d'aquests residus a la interacció del Cit c amb l'Apaf-1 i a l'activació de caspases mediada per l'apoptosoma. Aquesta informació és completaria amb un anàlisi equivalent per estructures de menor entitat molecular com són els hemopèptids preparats a partir d'alguns dels mutants de YCit c, així com per a una col·lecció de pèptids derivats de la seqüència de HHCit c que es van sintetitzar al Departament de Pèptids i Proteïnes del Instituto de Investigación Príncipe Felipe (València). Aquests pèptids comprenien els fragments 1-13, 23-40, i 58-75 de HHCit c (Figura 39) i per tant incloïen tots els residus crítics de l'epítip d'interacció. Aquesta aproximació basada en el disseny i síntesi de pèptids que siguin capaços de mimetitzar la funció de les proteïnes de les que es deriven, ha estat una estratègia àmpliament utilitzada com a base per al descobriment de moduladors d'aquells processos en que hi estan involucrades (Salgado, 2002).



**Figura 39.** Seqüència dels pèptids derivats de YCit c i HHCit c estudiats: (HP) HP7K25K 1-27Hsl, (P1) pHHCitc(1-13), (P2) pHHCitc(23-40) i (P3) pHHCitc(58-75). En les estructures dels citocroms es destaca en groc la seva localització. En vermell es destaquen els residus que constitueixen l'epítip de reconeixement de l'Apaf-1.

Per a aquests mutants de YCit c i derivats peptídics es varen fer mesures per avaluar la seva capacitat pro- i anti-apoptòtica, mitjançant assaigs d'activació de caspases (PC-9 i PC-3). Així mateix, es van fer assaigs emprant tècniques de polarització de fluorescència similars als reportats per Purring i col. (Purring, 1999) per tal de determinar la capacitat d'interacció amb Apaf-1. Finalment, es van realitzar també assaigs funcionals amb les construccions derivades d'Apaf, emprant els mateixos mètodes.

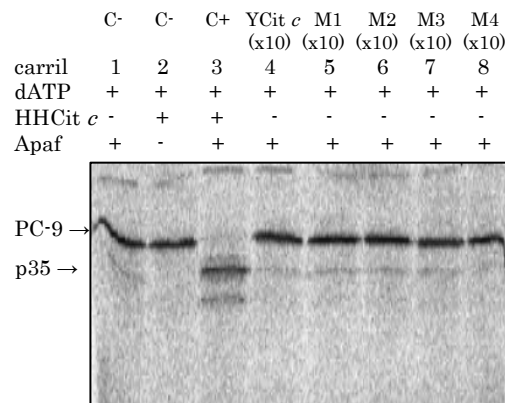
Per a la realització d'aquests assaigs calia disposar d'Apaf-1-XL, així com dels sistemes per produir *in vitro* la procaspasa-9 i determinar el seu processament, i obtenir extractes citoplasmàtics per determinar el processament de procaspasa-3. Aquestes metodologies es van posar a punt en el laboratori del grup col.laborador del Dr. Pérez-Payá (Malet, 2004), on es van realitzar dues estades per col.laborar en dur a terme part dels assaigs que es reporten en aquest capítol.

### 3.2 Assaigs d'activació de procaspasa-9.

L'activació de la procaspasa-9 constitueix l'etapa inicial de l'activació de l'apoptosi mediada per la via mitocondrial. L'activació d'aquesta caspasa iniciadora requereix de l'oligomerització d'Apaf-1 en presència d'ATP/dATP i Cit c, per donar lloc a l'apoptosoma actiu. Donat que és possible reproduir la formació de l'apoptosoma i l'activació de les caspases *in vitro*, mitjançant la incubació de les proteïnes recombinants Apaf-1, Cit c i procaspasa-9 en presència de dATP/ATP, aquest assaig ha estat àmpliament emprat a la literatura per a l'estudi dels mecanismes que regulen la formació i activitat de l'apoptosoma (Zou, 1999, 2003; Cain, 1999, 2000; Chai, 2000; Hu, 1999) i en concret per a la caracterització de la interacció entre Apaf-1 i Cit c (Yu, 2001).

L'assaig de reconstitució de l'apoptosoma *in vitro*, a partir de la incubació dels seus components fonamentals es va monitoritzar a través del processament de la procaspasa-9 marcada radiactivament. Així, es feien incubacions d'Apaf-1-XL i [<sup>35</sup>S-Met] procaspasa-9, en presència o absència de dATP, HHCit c i els mutants de YCit c o les molècules derivades de Cit c (Malet, 2004). A continuació, les barreges d'incubació s'analitzaven per electroforesi SDS-PAGE, de forma que l'activitat de l'apoptosoma es posava de manifest per la desaparició de la banda corresponent a la procaspasa-9 (~ 50 KDa) i la detecció d'una nova banda (~35 KDa) corresponent a la procaspasa-9 processada.

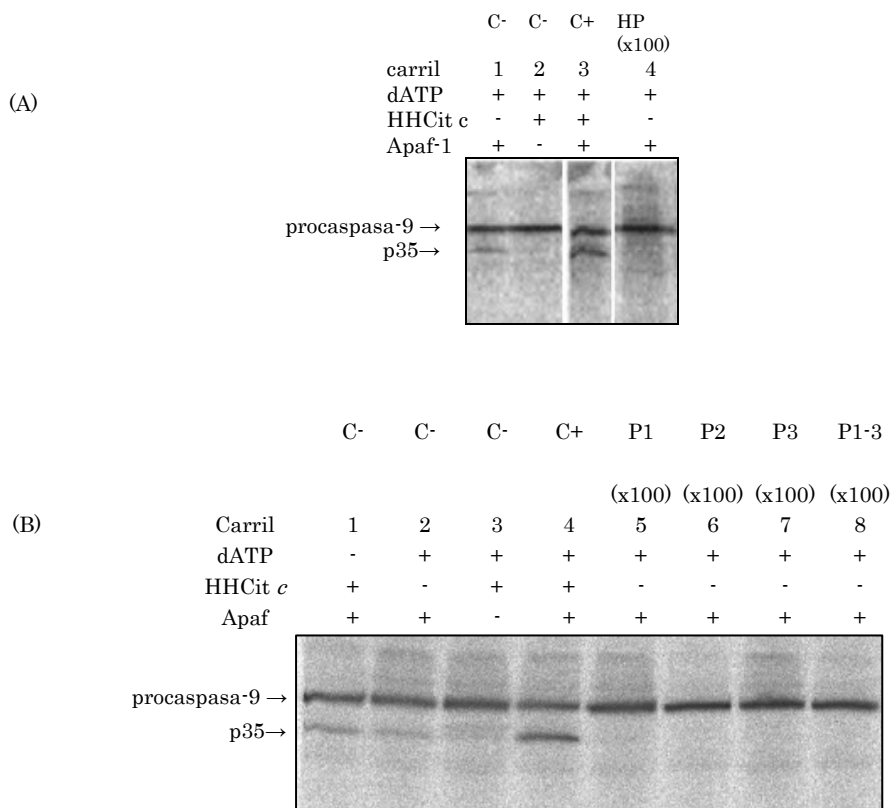
La Figura 40 mostra els resultats d'aquests assaigs pels mutants **(M1)** YCitc( $\Delta$ ), **(M2)** YCitc( $\Delta$ /A7K/K27M), **(M3)** YCitc( $\Delta$ /P25K/K27M) i **(M4)** YCitc( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M). Cap dels derivats de YCit c va mostrar activitat com a inductor del processament de PC-9, tot i estar presents a una concentració 10 vegades la del HHCit c, emprat al control positiu. Addicionalment també es va fer una incubació amb el YCit c, com a control negatiu.



**Figura 40.** Assaig de reconstitució de l'apoptosoma *in vitro*. Les incubacions es van dur a terme a 30 °C durant 1 h i sempre contienien 3  $\mu$ L de la [<sup>35</sup>S-Met]-procaspasa-9 transcrita *in vitro*, en un volum total de 20  $\mu$ L del tampó d'incubació. Els controls positiu i negatiu (C+ i C-) es van dur a terme en presència o absència de 800 ng d'Apaf-1-XL, 0,1 mM de dATP i 0,12  $\mu$ M (30 ng) de HHCit c. L'activitat del YCit c i dels mutants derivats es va avaluar substituint el HHCit c per aquests, a una concentració 10 vegades superior.

Es van fer assaigs anàlegs amb l'hemopèptid derivat del YCit c així com amb els pèptids derivats de la seqüència de HHCit c. Els resultats observats per la incubació de l'Apaf-1 i la [<sup>35</sup>S-Met]-procaspasa-9 en presència del dATP, per a l'hemopèptid **HP** (Figura 41 A) i els pèptids **P1**, **P2** i **P3** per separat i com a barreja equimolar de tots tres **P1-3** (Figura 41 B) van ser igualment negatius, tot i que es van dur a terme amb un excés de fins a 100 vegades respecte la concentració de HHCit c emprada als controls positius.





**Figura 41.** Assaig de reconstitució de l'apoptosoma *in vitro*. Les incubacions es van dur a terme en les condicions indicades a la Figura 40. L'activitat de l'hemopèptid **HP**, així com dels pèptids derivats de la seqüència de HHCit c, **P1**, **P2** i **P3**, es va avaluar substituint el HHCit c per aquests a una concentració 100 vegades superior.

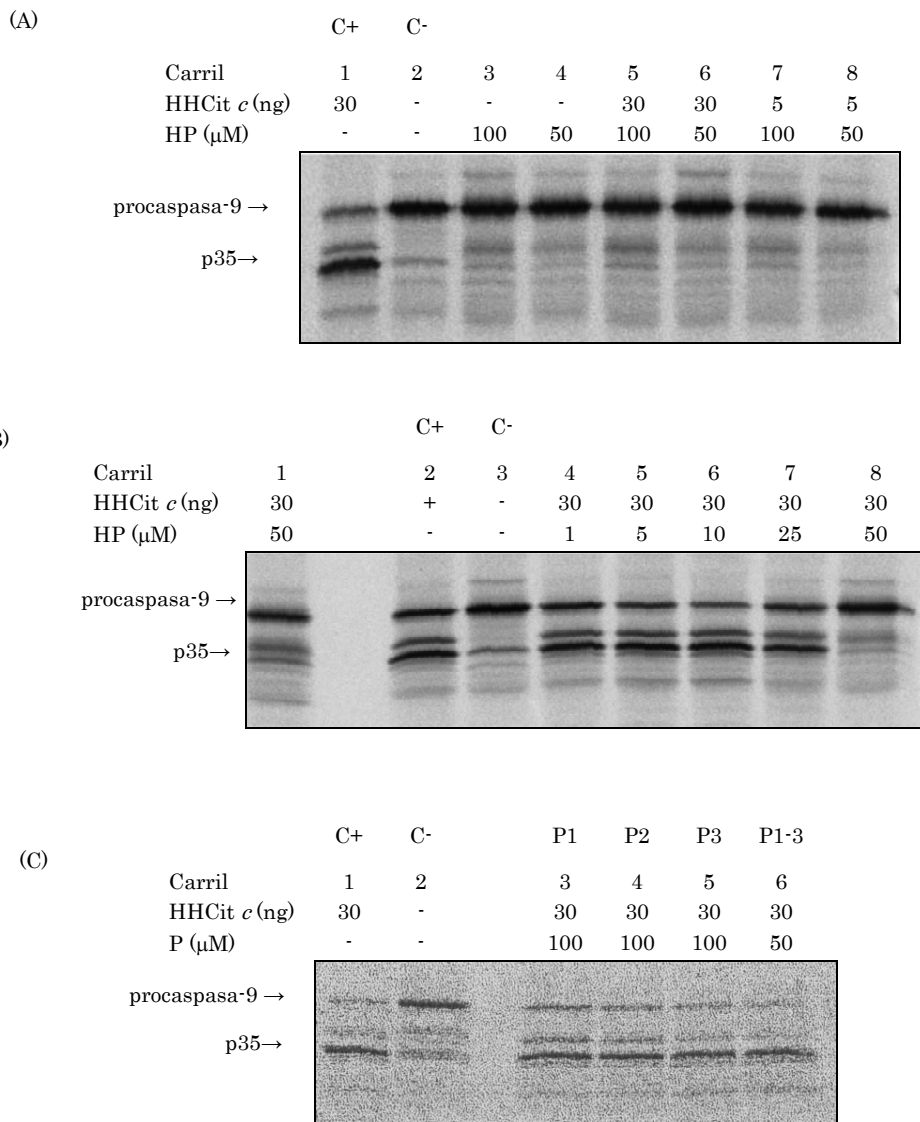
Aquests resultats contrastaven amb l'estudi reportat a la literatura per McLendon i col. Tot i que cal senyalar que la producció d'Apaf-1-XL, en la experiència del grup del Dr. Pérez-Payá, va resultar extremadament difícil i amb freqüència va donar problemes de reproduïbilitat, després de repetir els nostres assaigs un nombre de vegades, en cap cas es van obtenir resultats diferents dels que es mostren a les Figures 40 i 41. Això va resultar desconcertant ja que semblava indicar, en contra del que s'havia suggerit a la literatura, que la mutació dels residus 39 i 62-65 era essencial per a l'activitat del YCit c, i que l'expressió de YCit c en bacteri, que donava lloc a la modificació J72K, no bastava per dotar al YCit c d'una certa, encara que menor, capacitat proapoptòtica.

A la vista d'aquests resultats, els que es van obtenir amb l'hemopèptid HP i els pèptids P1-P3, reforçarien la hipòtesi que és necessari mantenir l'estructura tridimensional de tot el citocrom per tenir un efecte proapoptòtic. Això però, no semblava estrany tenint en compte la distribució al llarg de tota la superfície de Cit c

dels residus que conformen l'epítop d'interacció amb Apaf-1 identificat. Tot i així, calia confirmar si aquests compostos de menor entitat molecular eren capaços d'establir algun tipus d'interacció amb l'Apaf-1 que pogués pertorbar la formació de l'apoptosoma actiu.

Per avaluar aquesta possibilitat es van dur a terme assaigs de reconstitució d'apoptosomes *in vitro*, anàlegs als descrits, però fent una etapa prèvia consistent en una preincubació de l'Apaf-1 amb el pèptid corresponent. Addicionalment es van fer assaigs on no s'hi va afegir HHCit c, per confirmar els resultats obtinguts en quant a la capacitat activadora discutits a l'apartat anterior, o on aquest s'hi afegia en quantitats limitants (5 ng) per avaluar si una etapa prèvia de preincubació podria afavorir aquesta capacitat activadora. Els resultats obtinguts en analitzar els crús d'incubació van posar de manifest la capacitat inhibidora de l'hemopèptid, que ja es va observar a 50  $\mu$ M (Figura 42 A). L'efecte dosi dependent d'aquesta inhibició es va confirmar en experiments posteriors (Figura 42 B). D'altra banda es va realitzar un assaig equivalent per als pèptids derivats del HHCit c, però no es va observar aquesta capacitat inhibidora (Figura 42 C). Aquest resultat obtingut per a l'hemopèptid suggeria una possible interacció amb l'Apaf-1 durant l'etapa de preincubació que bloquejaria la posterior interacció amb el HHCit c. No obstant, assaigs de control realitzats amb posterioritat preincubant només amb el grup hemo (protoporfirin de ferro), van mostrar un efecte inhibidor similar a l'observat per a l'hemopèptid. Aquest resultat va apuntar a que en realitat, l'efecte inhibidor no era degut a una interacció específica de l'hemopèptid amb l'Apaf-1, sinó més bé a una reacció de tipus oxidatiu que inactivava la proteïna. En efecte, era conegut que la presència de l'àtom metàl·lic en hemopèptids similars, les anomenades microperoxidases (Adams, 1996), és capaç de catalitzar reaccions d'oxidació en presència d'agents oxidants com l'aigua oxigenada, o en reaccions d'activació d'oxigen. Aquestes observacions van ser confirmades posteriorment mitjançant contactes amb el Dr. A. G. Martin. Si bé és possible que en aquest efecte d'inhibició hi hagi també una contribució deguda a la unió de forma més o menys específica de l'hemopèptid a l'Apaf-1, es va desestimar continuar en aquesta direcció.

La incapacitat dels mutants de YCit c i de l'hemopèptid per promoure l'activació de l'apoptosoma es va confirmar mitjançant assaigs addicionals d'activació de caspasa-3 emprant extractes lliures de cèl·lules. Aquests assaigs van ser realitzats al laboratori del Dr. Pérez-Payà per la Laura Mondragón.



**Figura 42.** Assaigs d'inhibició de l'activació de PC-9 per a l'hemopèptid **HP** i els pèptids **P1-P3**. Després d'una preincubació de l'Apaf-1-XL (100-200 ng) amb el pèptid corresponent, a la concentració indicada en cada cas, les incubacions es van dur a terme a 30 °C durant 1 h i sempre contenen 3  $\mu$ L de la [ $^{35}$ S-Met] - procaspasa-9 transcrita *in vitro*, en un volum total de 20  $\mu$ L del tampó, 0,1 mM dATP, i la quantitat de HHCit *c* indicada en cada cas. Els controls positiu i negatiu (C+ i C-) es van dur a terme en presència o absència de 0,12  $\mu$ M (30 ng) de HHCit *c*. (A) Anàlisi de la capacitat activadora de la procaspasa-9, en absència de HHCit *c* (Carril 3, 4) o a concentració limitant d'aquest (Carril 7,8), i de la capacitat inhibidora (Carril 5, 6) de l'hemopèptid **HP**. (B) Anàlisi de l'efecte dosi depenent de la inhibició de l'**HP**. (C) Anàlisi de la capacitat inhibidora dels pèptids **P1** (Carril 3), **P2** (Carril 4) i **P3** (Carril 5) o d'una barreja equimolecular dels 3 (Carril 6).

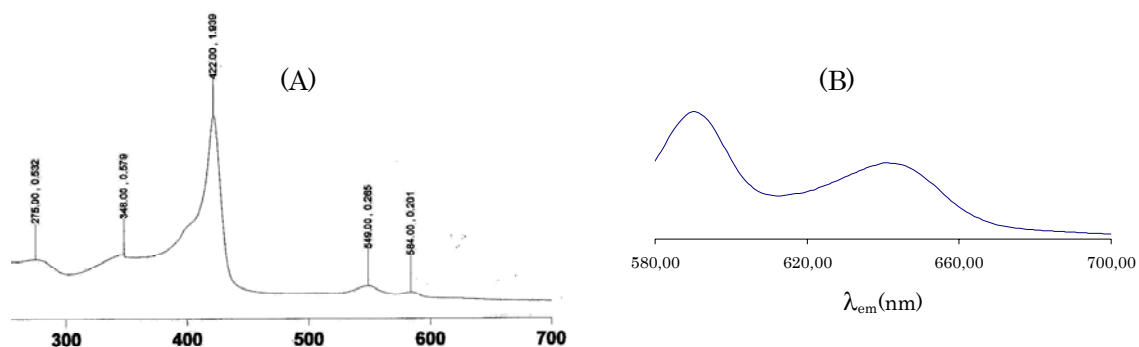
### 3.3 Assaigs de polarització de fluorescència.

A més dels assaigs d'activació-inhibició de l'apoptosoma descrits a l'apartat anterior, pel cas del mutant YCit c( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M) es van fer estudis preliminars d'interacció amb Apaf-1 emprant l'experiment de polarització de fluorescència que havia estat utilitzat originalment pel grup de McLendon per caracteritzar la interacció Cit c - Apaf-1 (Purring, 1999). Aquest mètode requeria la preparació d'un derivat fluorescent del HHCit c, en el que s'havia substituït l'àtom metàl·lic del grup prostètic per Zn(II). La espècie resultant és estructuralment equivalent a la salvatge en quant a la seva capacitat d'unió als *partners* fisiològics de Cit c (Vanderkooi, 1977; Anni, 1995). La monitorització de la fluorescència del Zn-HHCit c proporciona un mètode addient per avaluar la seva interacció amb l'Apaf-1. En aquest sentit, el Cit c és una proteïna petita, ~ 12 kDa, i en conseqüència, el seu temps de correlació rotacional és relativament ràpid respecte l'escala de temps de la fluorescència. Així, quan el seu derivat fluorescent és excitat amb una font de llum polaritzada, la majoria de les molècules rotaran abans de que es produeixi la fluorescència, i per tant la polarització mesurada serà baixa, donat que serà majoritàriament despolaritzada durant l'emissió (English, 1992). En canvi, quan el Zn-HHCit c interacciona amb l'Apaf-1, donat el seu pes molecular força més elevat (148 KDa per l'Apaf-1-XL) el complex resultant rotarà més lentament que el Zn-HHCit c sol, resultant en un augment de la polarització. La polarització es calcula d'acord amb la fórmula següent:

$$P = (I_{\parallel} - G I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G I_{\perp})$$

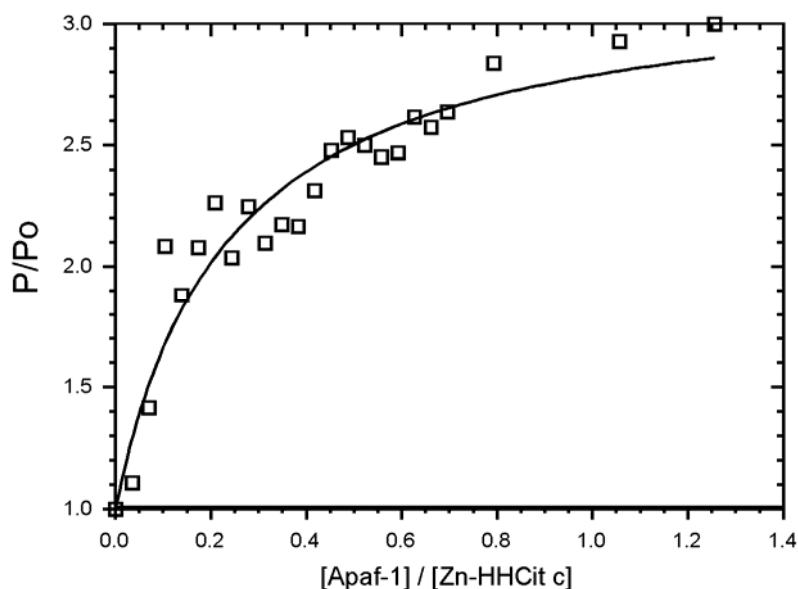
on  $I_{\parallel}$  i  $I_{\perp}$  corresponen a les intensitats d'emissió en sentit paral·lel o perpendicular al feix de la llum d'excitació, i G és un factor de correcció, característic del sistema de detecció emprat (Purring-Koch, 2000).

El derivat fluorescent Zn-HHCit c es va obtenir per tractament del HHCit c amb àcid fluorhídric, que dona lloc al Cit c-porfirina, per a continuació introduir l'àtom de Zn(II) per tractament amb una sal d'aquest metall (Vanderkooi, 1975, 1976). La formació de l'intermedi i del producte final es van monitoritzar mitjançant l'anàlisi d'alíquotes dels crus per espectroscòpia d'absorció electrònica i de fluorescència (Figura 43).



**Figura 43.** Espectres d'absorció electrònica (A) i fluorescència (B,  $\lambda_{exc} = 550$  nm) de Zn-HHCit c.

Es va dur a terme la titulació d'una solució 10  $\mu$ M de Zn-HHCit c fent addicions successives d'una solució 6.5  $\mu$ M d'Apaf-1-XL, fins arribar a un excés molar d'aproximadament 1.27:1 Apaf-1 – Cit c. Per a cada addició es van fer 10 mesures de la polarització de fluorescència en un temps total de 5 minuts, comprovant que la mesura inicial es mantenia estable en el temps per a cada addició i es va agafar el promig de totes elles com a valor de polarització, el qual es va referenciar respecte a la mesura inicial ( $P_0$ ).



**Figura 44.** Corba d'unió del Zn-HHCit c a Apaf-1-XL, emprant mesures polarització de fluorescència ( $\lambda_{exc} = 550$  nm,  $\lambda_{em} = 587$  nm). Es van fer tres repeticions de l'experiment amb resultats semblants. La línia continua representa l'ajust de les dades experimentals a un model d'unió a un únic lloc, amb  $K_a = 4,3 \pm 0,8$   $\mu$ M $^{-1}$ ,  $P_{max}/P_0 = 3,2 \pm 0,1$  ( $r^2 = 0,99$ ).

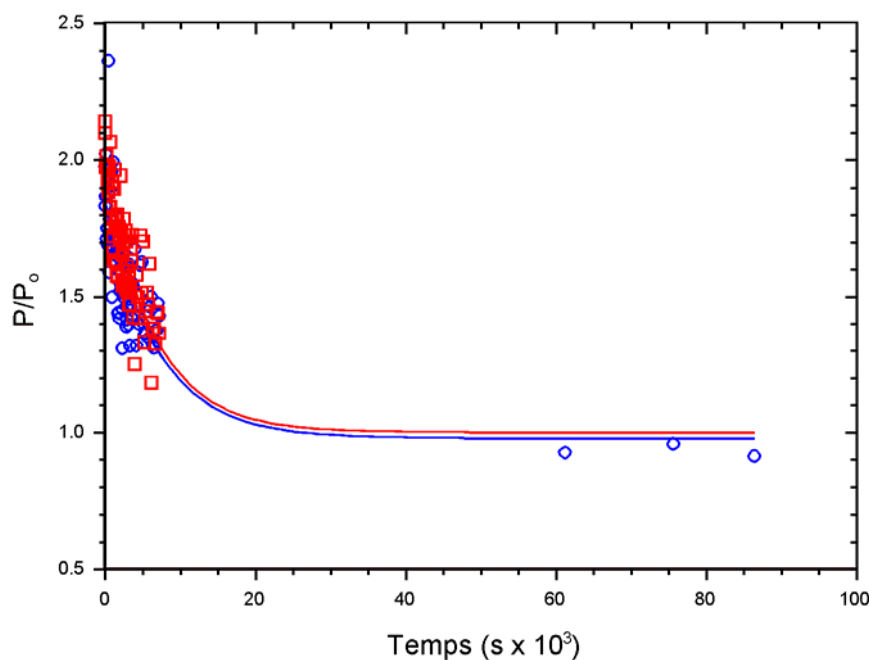
Tal com il·lustra la Figura 44, la representació dels valors de P/P<sub>0</sub> va mostrar un increment en augmentar la concentració d'Apaf-1 afegit, el qual es va atribuir a la unió del citocrom fluorescent a l'Apaf-1. La dispersió de les dades van fer difícil ajustar els resultats a un model d'unió de forma inequívoca, no obstant es va obtenir un bon ajust emprant un model que considera un únic lloc d'unió, segons l'equació

$$P/P_0 = ((P_{\max}/P_0) K_a [Apaf-1] + 1) / (K_a [Apaf-1] + 1)$$

Aquest resultat diferia respecte als resultats reportats per McLendon i col. (Purring, 1999) que recolzaven l'existència de dos llocs d'unió, però estava d'acord amb les dades estructurals més recents que indiquen l'estequiometria 1:1 per a la interacció Cit c – Apaf-1 (Yu, 2005). D'altra banda, en el nostre cas, el valor de K<sub>a</sub> no es tan elevat com el que es suggeria al treball de McLendon i col. (K<sub>a</sub> ~ 10<sup>11</sup> M<sup>-1</sup>), no obstant al mateix treball no es descartava la possibilitat d'una unió amb afinitat més baixa (K<sub>a</sub> ~ 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>) amb un únic lloc d'unió. Aquestes diferències poden originar-se també per les diferents condicions emprades al nostre assaig. De fet, les condicions en que aquells autors van realitzar les seves mesures eren a una dilució més elevada que les emprades en el nostre cas, el qual donava lloc en el seu cas a una resposta més baixa per l'assaig (P<sub>max</sub>/P<sub>0</sub> ~ 1,3, veure Figura 6, plana 20). No es pot descartar, no obstant, que aquestes diferències s'originin en part també per problemes relacionats amb les estabilitats de les mostres de proteïna (agregació de l'Apaf-1, descomposició del Zn-HHCitc,...), tot i que es va intentar mantenir-les en tot moment a baixa temperatura i en condicions de foscor.

Un cop es va comprovar la formació del complex Apaf-1-XL - Zn-HHCit c en les condicions emprades, es va procedir a determinar la reversibilitat d'aquesta unió en experiments de competència amb HHCit c i el mutant YCit c(ΔA7K/P25K/K27M). Aquests experiments havien estat reportats també al treball original de McLendon (Purring, 1999), observant-se una disminució de la polarització de la fluorescència amb el temps en addicionar a una dissolució que contenia el complex Apaf-1 - Zn-HHCit c un gran excés de HHCit c, que s'atribuïa al desplaçament del derivat fluorescent del complex. D'aquesta manera s'havia determinat una vida mitja per a la reacció de competició d'aproximadament 1,5 h, amb una velocitat de dissociació del complex Apaf-1- HHCit c de 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, mentre que la seva formació era molt més ràpida, estimant-se entorn a 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Es van preparar dissolucions equivalents a la de l'experiment de polarització anterior, amb la mateixa concentració de Zn-HHCit c de partida i on s'hi va addicionar la quantitat d'Apaf-1-XL necessària per arribar a una saturació d'aproximadament 80-90 % del Zn-HHCit c present a la dissolució, per evitar tenir un excés d'Apaf-1-XL lliure. Segons l'experiment anterior, aquestes condicions es corresponien amb una relació Apaf-1:Zn-HHCit c entorn a 0,5 ( $P/P_0 \sim 2.5$ ,  $P_{\max}/P_0 \sim 3.2$ ). Es va enregistrar la polarització de la fluorescència de la dissolució de Zn-HHCit c de partida ( $P_0$ ) i la del complex Zn-HHCit c i Apaf-1-XL corresponent a  $t=0$ . A continuació s'hi va addicionar HHCit c amb un excés molar 20:1 respecte al Zn-HHCit c, i es va enregistrar el valor de la polarització ( $P$ ) a intervals d'1 min, fins un temps total de 2 h, comprovant-se que es produïa una disminució que arribava als valors de la polarització de partida ( $P_0$ ) (Figura 45). Aquest valor es mantenia constant passades  $\sim 20$  h. Aquest experiment es va repetir amb el mutant YCit c ( $\Delta/A7K/P25K/K27M$ ), que incorporava totes les mutacions objecte d'estudi, observant-se uns resultats molt similars (Figura 45).



**Figura 45.** Variació del valor de  $P/P_0$  amb el temps per a una dissolució que conté el complex format per l'Apaf-1 i el Zn-HHCit c després de l'addició d'un excés molar 20:1 de HHCit c (vermell) o YCit c ( $\Delta/A7K/P25K/K27M$ ) (blau). Les línies contínues representen l'ajust a un model de decaïment exponencial (vermell:  $A_0 = 1.0 \pm 0.3$ ,  $k_{\text{off}} = 1.5 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ; blau:  $A_0 = 0.8 \pm 0.1$ ,  $k_{\text{off}} = 1.4 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

Les dades d'aquests experiments es van ajustar a un model de decaïment exponencial, definit per la equació  $P/P_0 = A_0 \exp(-k_{\text{off}} t) + B$ . Tal com es mostra a la

Figura 45, els valors de  $k_{off}$  determinats d'aquesta manera són de l'ordre de  $10^{-4} s^{-1}$ , valor que coincideix amb el reportat en el treball de McLendon pel HHCit c desplaçant al Zn-HHCit c del complex amb Apaf-1.

Aquest resultat suggereixen per tant la capacitat del mutant de YCit c per desplaçar el Zn-HHCit c del complex amb l'Apaf-1-XL amb una velocitat de dissociació similar a la determinada pel HHCit c. El fet que aquest mutant donés resultats negatius en els experiments d'activació de PC-9, suggeririen que si bé aquesta proteïna no és capaç d'induir l'activitat proapoptòtica, si podria actuar com a inhibidor de l'activitat induïda per HHCit c. Aquesta activitat inhibidora podria ser present a l'hemopèptid derivat d'aquest mutant de YCit c, no obstant, com ja s'ha comentat, això hauria quedat enmascarat per l'efecte inespecífic de la presència del grup prostètic, capaç d'inactivar l'activitat proapoptòtica de l'apoptosoma donades les seves propietats com a catalitzador d'oxidació.

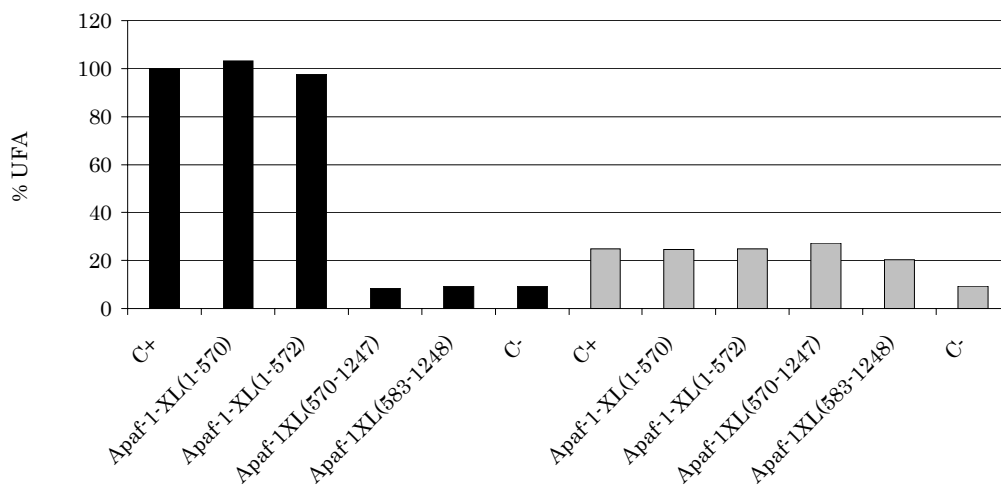
#### **3.4. Caracterització funcional de les construccions CARD-NOD/CED4 i WDR derivades d'Apaf-1-XL.**

Per tal de caracteritzar les proteïnes recombinants derivades de l'Apaf-1-XL, obtingudes segons s'ha descrit al capítol 2, es va procedir a avaluar la seva funcionalitat. Es van realitzar dos tipus diferents d'assaigs, segons si les construccions corresponien als dominis *N*-terminal o *C*-terminal.

Per a les construccions corresponents al fragment de seqüència que comprenia els dominis CARD i NOD/CED-4, Apaf-1-XL(1-570) i Apaf-1-XL(1-572), es va avaluar la seva capacitat d'activació de caspases mediada per l'apoptosoma, donat que havia estat reportada a la literatura l'activitat proapoptòtica constitutiva de les construccions derivades d'Apaf-1 en les que s'havia deletat el domini *C*-terminal WDR (Hu, 1998; Srinivasula, 1998). Així, es van realitzar els assaigs d'activació de caspases en extractes lliures de cèl.lules, emprant una fracció obtinguda a partir d'extractes de cultius cel.lulars HEK293, en la que s'havia eliminat l'Apaf-1, però que contenien diferents components de la maquinària apoptòtica, entre ells PC-9, PC-3 i Cit c (fracció *FT*). L'activació de les caspases es duia a terme complimentant-los amb Apaf-1 i dATP. Es va valorar l'activació de la caspasa-3 emprant el substrat fluorogènic Ac-DEVD-afc, monitoritzant l'alliberament de l'afc. Es va determinar l'activitat per incubació de cadascuna de les dues construccions d'Apaf-1-XL corresponents als dominis *N*-terminal amb aquesta fracció. Igualment es van realitzar assaigs d'incubació amb l'Apaf-1-XL, com a control positiu (C+) i sense addicionar-hi



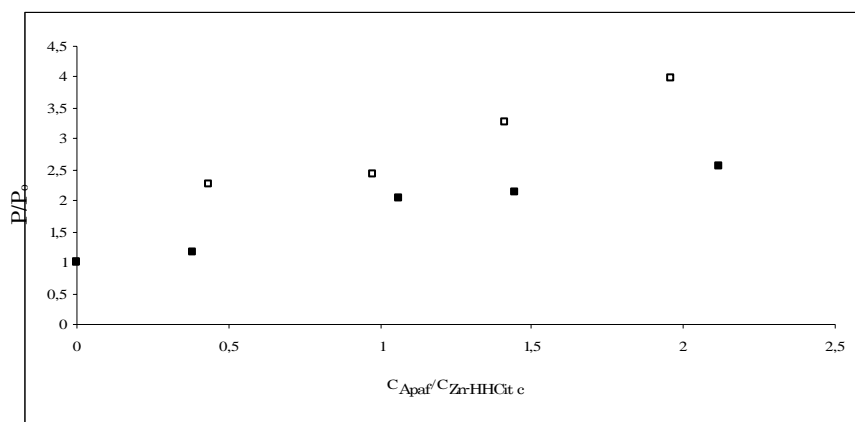
Apaf-1-XL, control negatiu (C-). Addicionalment es van realitzar incubacions amb les construccions corresponents als dominis C-terminal, Apaf-1-XL(570-1247) i Apaf-1-XL(583-1248) per comprovar la seva manca de capacitat activadora de la procaspasa-3. Les incubacions es van realitzar per duplicat, a 37 °C i sense activar mantenint la barreja a 0 °C, com a control negatiu. Les mesures de fluorescència enregistrades (Figura 46), expressades com a % UFA, unitats arbitràries de fluorescència, respecte el control positiu, van posar de manifest la capacitat activadora de la procaspasa-3 per a les dues construccions N-terminals, similar a l'observada per a l'Apaf-1-XL. Per a les construccions C-terminals no es va mesurar activitat a 37 °C ni a 0 °C.



**Figura 46.** Assaigs *in vitro* de capacitat activadora de les caspases per a les construccions derivades d'Apaf-1-XL. En negre es mostra el % de fluorescència, expressada com UFA, respecte el C+, corresponent a l'assaig d'incubació amb l'Apaf-1-XL de les mostres activades a 37 °C i en gris, el % de fluorescència de les mostres que es van mantenir inactivades a 0 °C.

Per caracteritzar les construccions corresponents al domini C-terminal es va analitzar la seva capacitat per interaccionar amb el citocrom c. Les construccions Apaf-1-XL(570-1247) i Apaf-1-XL(583-1248) corresponien al domini WDR, reportat com a responsable de la interacció de l'Apaf-1 amb el citocrom c, necessària per al canvi conformacional que permetrà la formació de l'apoptosoma actiu. Aquesta capacitat d'interacció es va avaluar mitjançant assaigs de polarització de fluorescència amb el derivat fluorescent Zn-HHCit c. Els assaigs es van dur a terme de forma equivalent a la descrita anteriorment per a la tritracció del Zn-HHCit c. Així, es va enregistrar el valor de la polarització de la fluorescència d'una solució 400 nM de Zn-HHCit c ( $P_0$ ) sobre la que es van fer successives addicions d'alíquotes de les

dissolucions corresponents a cadascuna de les construccions Apaf-1-XL(570-1247) i Apaf-1-XL(583-1248), fins arribar a una concentració d'Apaf equivalent a una relació molar 1 : 1 (Apaf-1 : Cit c), enregistrant el valor de la polarització de la fluorescència posterior a cada addició. L'augment del valor de  $P/P_0$  amb la concentració del domini WDR d'Apaf-1-XL present a la dissolució observat per a totes dues construccions (Figura 47), indicava la formació d'un complex amb el Zn-HHCit c, i per tant la capacitat de totes dues proteïnes recombinants per interaccionar amb el Cit c. A diferència dels resultats observats a l'assaig de tritració amb l'Apaf-1-XL sencera, per a les construccions derivades d'aquesta no es va arribar a observar la saturació del Zn-HHCit c present a la dissolució, el qual suggereix una menor afinitat per a aquestes construccions. Això es pot racionalitzar com a resultat de l'absència dels dominis CARD i NOD/CED4, donat que aquests també contribueixen a l'afinitat de l'Apaf-1 pel Cit c. La poca disponibilitat de proteïna no va permetre fer les determinacions amb prou quantitat de punts com per extreure informació quantitativa.



**Figura 47.** Valors de  $P/P_0$  enregistrats per a la solució resultant de successives addicions d'alíquotes de les dissolucions d'Apaf-1-XL(570-1247) (□) i d'Apaf-1-XL(583-1248) (■) sobre una solució de Zn-HHCit c.

## 4. CARACTERITZACIÓ DEL MECANISME D'ACTIVACIÓ DE NOD2 EN RESPOSTA A MURAMILDIPÈPTID (MDP). IDENTIFICACIÓ BIOQUÍMICA DEL COMPLEX DE RECONeixEMENT DE MDP.

### 4.1. Introducció

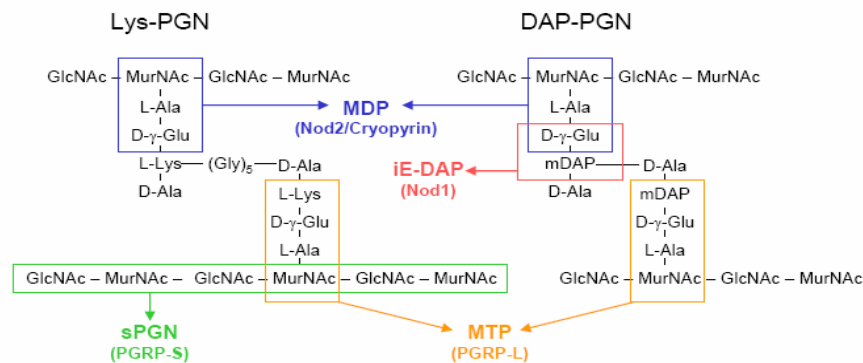
Nod2 és membre d'una família de proteïnes citosòliques que es caracteritzen per la presència d'un domini conservat d'unió a nucleòtid i oligomerització, NOD (*Nucleotide oligomerization domain*) (Inohara, 2005). Mutacions al gen que codifica per Nod2 han estat relacionades amb malalties autoimmunes com la malaltia de Crohn (CD, *Chron's disease*) i la síndrome de Blau (Inohara, 2003, 2005). La malaltia de Crohn és una malaltia intestinal que es caracteritza per una inflamació crònica de l'intestí, i presenta una prevalència de 100 casos per cada 100.000 persones als països occidentals (Fiocchi, 1998). Variants genètiques específiques de Nod2 han estat associades amb malalties inflamatòries, i en concret 3 mutacions de Nod2, R702W, G908R i 1007fsinsC estan associades amb susceptibilitat a CD (Ogura, 2001a). Així, cèl.lules de macròfag i cèl.lules mononuclears de la sang perifèrica de pacients de CD homozigots per aquestes mutacions, són defectuoses en la seva capacitat d'activar NF- $\kappa$ B i en la secreció de citoquines, en resposta a l'estimulació amb el lligand de Nod2, muramil dipèptid (MDP), el que suggereix que aquestes mutacions a Nod2 resulten en una pèrdua de funció (Inohara, 2003; Li, 2004; Netea, 2005). Igualment, el seu patró d'expressió a cèl.lules del sistema immune i de l'intestí, suggereix que aquesta proteïna tindria una funció a la immunitat innata i possiblement al sistema de defensa de la mucosa intestinal. En aquest sentit, l'expressió de Nod2 es veu incrementada per l'estimulació amb molècules pro-inflamatòries, com el TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i lipopolisacàrid (LPS) (Gutierrez, 2002). Igualment s'ha

determinat el paper de Nod2 com a factor antibacterià a un model d'infecció amb *Salmonella typhimurium* a cèl.lules de l'epiteli intestinal Caco2 (Hisamatsu, 2003) i s'ha determinat que ratolins deficients en Nod2 són més susceptibles a la infecció oral amb *Listeria monocytogenes* (Kobayashi, 2005). Aquests resultats donen suport al paper de Nod2 en la defensa antibacteriana a l'intestí i fan èmfasi en la importància d'una correcta activació i regulació de la senyalització mediada per Nod2 pel control de la resposta inflamatòria. Entendre el funcionament de Nod2 i identificar els mecanismes moleculars que regulen la seva activitat, per tant, resulta important per dilucidar com les alteracions en aquests mecanismes contribueixen al desenvolupament de les malalties inflamatòries intestinals.

#### 4.1.1 Reconeixement del muramildipèptid (MDP) per Nod2.

Un dels components principals de la paret bacteriana és el peptidoglicà (PGN), l'estructura del qual està formada pels sucres N-acetylglucosamina (GlcNAc) i N-acetilmuràmic (MurNAc) units per cadenes peptídiques curtes (Figura 48). Estudis inicials van posar de manifest que certs PGN i lipopolisacàrids (LPS) estimulaven Nod2 (Inohara, 2001). Estudis bioquímics i funcionals posteriors van determinar que Nod2 detecta les bactèries mitjançant el reconeixement d'un component específic del PGN, el muramildipèptid (MurNAc-L-Ala-D-isoGln, MDP) (Girardin, 2003; Inohara 2003). El MDP és un component comú a la majoria dels PGN, el que suggereix que Nod2 actuaria com un sensor d'un ampli ventall de bacteris. Aquest és un reconeixement estereoselectiu, com demostra el fet que la substitució de L-Ala per D-Ala o D-isoGln per L-isoGln elimina aquesta capacitat (Inohara 2003). El MDP està present a la quasi totalitat de bactèries Gram positives i Gram negatives, i indueix citokines proinflamatòries com el factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumour Necrosis Factor*) i IL-1 $\beta$ , importants a la resposta immunitària innata. Addicionalment, el MDP també indueix la secreció d'altres citokines per part de monòcits i cèl.lules dendrítiques, així com l'expressió de molècules coestimuladores lligades a membrana, el que provoca la diferenciació de cèl.lules T *naïve* a cèl.lules T efectores. Això indica que Nod2 té un paper d'unió entre la resposta immunitària innata i adquirida. El reconeixement d'aquestes molècules per part de les proteïnes NOD requereix de residus específics del seus LRRs C-terminals, com s'ha demostrat mitjançant l'anàlisi de mutants puntuals i de deleció de Nod2 (Tanabe, 2004). Mutacions en aquest domini han estat relacionades amb la susceptibilitat a la malaltia de Crohn (Inohara, 2003),

el que suggereix que aquestes mutacions de pèrdua de funció estan afectant la capacitat de Nod2 per reconèixer el MDP (Tanabe, 2004).



**Figura 48.** Generació de MDP, muramildipèptid, MTP, muramiltripèptid, i iE-DAP, a partir del peptidoglicà bacterià (McDonald, 2005).

El model actual per a l'activació de Nod2 es basa en els estudis sobre un altre membre de la família NOD, l'Apaf-1. L'anàlisi de 519 mutants de Nod2 descrit per Tanabe i col. (Tanabe, 2004) va determinar que les mutacions que resultaven en una pèrdua del reconeixement del MDP involucraven residus localitzats a la regió C-terminal dels LRRs. Estudis preliminars realitzats al laboratori del Prof. Núñez, en que s'analitzaren per cromatografia de gel filtració cèl.lules estimulades amb MDP, demostraven que Nod2 formaria un complex d'elevat pes molecular. En aquest sentit, altres proteïnes de la família NOD, Nalp-1 i Criopirina, també són capaces de formar complexos d'elevat pes molecular en condicions específiques (Agostini, 2004; Martinon, 2002). Igualment, l'oligomerització artificial de Nod1 o Nod2 s'ha mostrat suficient per a l'activació de la via de senyalització NF-κB (Inohara et al., 2000; Ogura, 2001b).

En base a aquests precedents i dins d'una línia de treball que s'estava duent a terme al laboratori del Prof. Núñez per tal d'identificar i caracteritzar les proteïnes involucrades a l'activació de Nod2 pel MDP, es va proposar com a objectiu del treball a desenvolupar al llarg d'una estada de 6 mesos en aquell grup (Departament de Patologia Molecular, *University of Michigan*, Ann Arbor, EUA), dur a terme diferents aproximacions per a la caracterització bioquímica del complex de reconeixement de MDP.

#### 4.2. Assaigs d'unió *in vitro*.

D'acord amb el que s'havia proposat, calia determinar en primer lloc si el reconeixement del MDP per part de Nod2 té lloc mitjançant una interacció directa lligand-proteïna, o si hi intervenen d'altres factors que són necessaris per a l'activació de Nod2 en resposta a MDP. En aquest sentit, un treball recentment reportat per Chen i col. suggeria que Nod2 no s'uneix directament al MDP, sinó que requereix de molècules addicionals per a la seva activació (Chen et al., 2005). Amb aquest objectiu es van dur a terme assaigs d'unió *in vitro*. Aquests permetrien alhora l'aïllament i posterior identificació de les possibles proteïnes involucrades en el reconeixement del MDP requerides per a l'activació de Nod2.

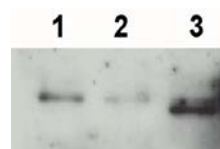
##### 4.2.1. Assaigs d'immunoprecipitació de HA-Nod2 emprant MTP-biotina.

Per tal de determinar si es podia detectar una interacció directa entre el MDP i Nod2 es van realitzar assaigs d'immunoprecipitació emprant cèl.lules que expressen la proteïna en forma de fusió amb l'epítot HA, HA-Nod2. Així, lisats procedents de cèl.lules HEK293T que sobreexpressen HA-Nod2 de forma estable, es van incubar amb i sense (control negatiu) MTP-biotina. El MTP (muramil tripèptid, Ac(muramyl-Ala-D-IsoGln-Lys (Estearoyl)-OH) conté un residu de Lys addicional respecte al MDP i és igualment efectiu en l'activació de Nod2. L'ús de MTP en lloc de MDP, en tenir un residu addicional a l'extrem C-terminal, permet evitar possibles interferències que puguin originar-se per la proximitat del grup de biotina fent que el motiu corresponent al MDP resti més accessible als possibles lligands amb els que pugui interaccionar. Per aquesta raó, a diversos experiments que es descriuran al llarg dels següents apartats, es va emprar MTP en lloc de MDP quan es va voler treballar amb derivats del MDP que implicaven formació d'un enllaç amb aquest. En aquest sentit, s'havia demostrat que el reconeixement del MDP era molt sensible a modificacions en la seva estructura, com posava de manifest la manca de capacitat activadora de Nod2 dels derivats LL-MDP o DD-MDP (Inohara, 2003).

Després de fer una incubació amb estreptavidina-agarosa, per tal de recuperar la MTP-biotina dels lisats, l'anàlisi per electroforesi - *Western-blot* emprant un anticòs monoclonal anti-HA, no va donar resultats positius, obtenint-se el mateix resultat per a la mostra corresponent a l'experiment i pel control. Tot i emprar les condicions d'incubació descrites per Chen i col., que van permetre determinar la unió de MDP a Calreticulina (Chen, 2005), en cap cas es va observar la banda corresponent a la

presència de Nod2 que hauria indicat la seva interacció amb el MDP, tot i que sí es detectava als lisats de partida.

Per tal de descartar que aquests resultats negatius fossin deguts a una baixa concentració de Nod2 als lisats cel.lulars, es va intentar enriquir la mostra de partida en HA-Nod2. Així es va repetir de l'experiment anterior, emprant les mateixes condicions d'incubació, però duent a terme una etapa prèvia de immunopurificació. Amb aquest objectiu els lisats cel.lulars es van incubar amb un anticòs anti-HA monoclonal, que es recuperava del lisat per incubació posterior amb proteïna-G-agarosa. La proteïna unida a l'agarosa es va eluir per tractament amb un tampó de pH àcid. Com a control negatiu addicional, es van emprar lisats que provenien de cèl.lules HEK293T que expressaven de forma transitòria un mutant de Nod2 associat a la malaltia de Crohn, HA-Nod2L1007fs, incapaç de respondre a la presència de components bacterians (Tanabe, 2004). Els resultats observats en analitzar les mostres finals resultants de la incubació amb o sense MTP-Biotina i posterior recuperació amb estreptavidina-agarosa (Figura 49), van donar resultats que no permetien extreure cap conclusió ja que s'observava una banda de Nod2 tant a la mostra provinent dels lisats que expressaven HA-Nod2 com en el control negatiu, provenint dels lisats que expressaven HA-Nod2L1007fs. L'aparició d'una banda de Nod2 també al control que no havia estat tractat amb MTP-biotina suggeria que hi havia una unió inespecífica de la proteïna a l'agarosa.



**Figura 49.** Anàlisi per *Western-Blot* de les mostres corresponents als experiments d'immunoprecipitació amb anti-HA i posterior assaig de precipitació amb MTP-biotina. **1:** lisats cel.lulars que expressaven HA-Nod2 i no van ser incubats amb MTP-biotina. **2 i 3:** mostres provinents d'incubar amb MTP-biotina els lisats cel.lulars que expressaven HA-Nod2 i HA-Nod2L1007fs respectivament.

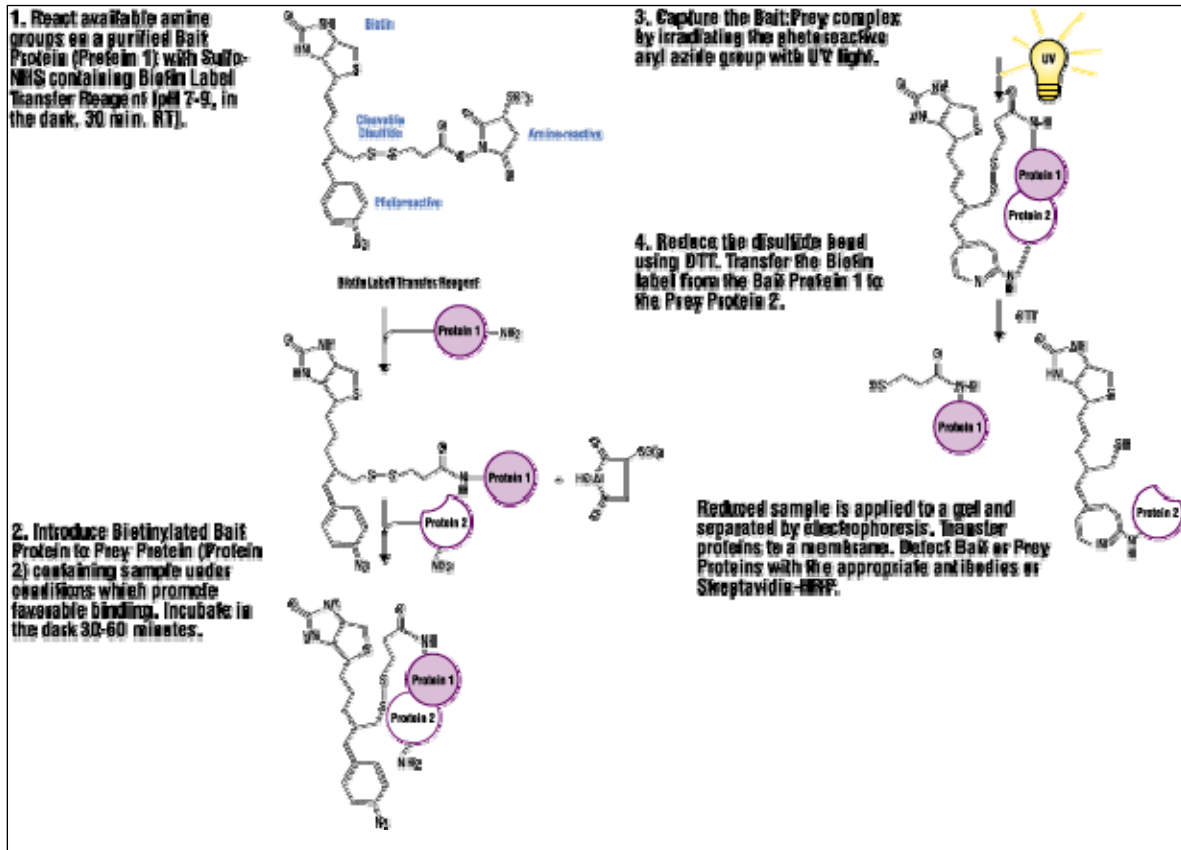
#### 4.2.2. Assaig d'entrecreuament.

Una possible explicació per a la manca de detecció de Nod2 al primer dels experiments detallats a l'apartat anterior seria un caràcter transitori de la interacció entre el MDP i Nod2. D'altra banda, per tal de minimitzar la interacció inespecífica amb l'agarosa observada per al segon dels experiments descrits a l'apartat anterior, seria necessari dur a terme una etapa de rentats emprant condicions més restrictives,

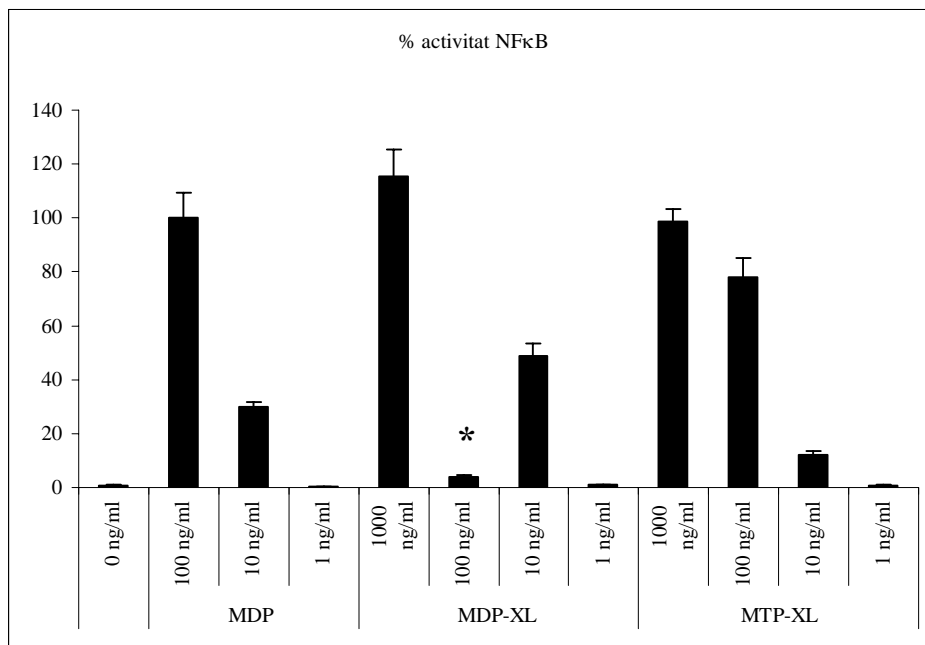
el que podria desestabilitzar la unió amb Nod2 o les proteïnes que hi interaccionessin amb el MDP. Així, per tal d'estabilitzar la unió entre el MDP i Nod2 o les possibles proteïnes responsables del reconeixement del MDP i transducció del senyal d'activació en resposta a la presència del lligand a Nod2, es va optar per assajar una estratègia d'entrecreuament químic emprant el *ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit* (Pierce). Es va seguir el procediment que s'il·lustra a l'esquema de la Figura 50. Cada molècula del reactiu d'entrecreuament (XL) conté un grup capaç de reaccionar amb una amina lliure present a la proteïna o pèptid a estudiar, en aquest cas el MDP o MTP. A més, conté un grup fotoreactiu capaç de formar un enllaç covalent amb molècules properes, que presentin també grups amina accessibles, en irradiar amb llum ultraviolada (UV). Això permet que, prèvia incubació amb el potencial lligand del MDP/MTP, en irradiar el cru, es generi un enllaç covalent amb aquest lligand. D'aquesta manera, el lligand de MDP/MTP quedaria covalentment unit a un derivat de biotina, que permetria dur a terme la posterior purificació per incubació amb estreptavidina-agarosa. Així, en primer lloc es va procedir a obtenir els derivats de MDP i MTP amb XL seguint el protocol del fabricant. Un cop obtinguts, s'incubava amb els lisats cel·lulars equivalents als descrits a l'apartat anterior. Com a controls negatius es van emprar mutants de Nod2 que no responen als derivats bacterians, HA-Nod2L1007fs i HA-Nod2ΔLRR, en el que s'havia eliminat el domini C-terminal (Tanabe, 2004). També es va emprar Nod1 com a control negatiu, ja que s'ha determinat que és incapaç d'interaccionar amb el MDP (Inohara, 2001).

En aquest cas els resultats observats en fer l'anàlisi per *Western-blot* emprant l'anticòs monoclonal anti-HA, van posar novament de manifest una unió inespecífica de les proteïnes a la resina. Aquesta unió inespecífica no es va poder eliminar tot i incrementar el percentatge de detergent present als tampó d'incubació fins 0,1 % de tween-20, o la força iònica dels tampons de rentat afegint 150 mM NaCl, ni tampoc en disminuir els temps d'incubació fins a 5 min, o addicionar-hi 50 mM Gly com agent bloquejant. Per tal d'evitar aquesta unió no específica observada a l'experiment anterior, es va procedir a fer la incubació *in vitro* del MDP-XL o MTP-XL amb cèl·lules en cultiu, en lloc de amb lisats cel·lulars. D'aquesta manera es pretenia minimitzar les interaccions inespecífiques, en permetre al MDP-XL o MTP-XL dirigir-se a la seva localització cel·lular específica, de forma que es facilitaria la seva interacció amb els seus lligands. Com a assaig preliminar es va comprovar la capacitat del MDP o MTP units al XL de ser captats per la cèl·lula i d'activar la resposta cel·lular (Figura 51) mitjançant un assaig d'activació del NF-κB (Tanabe, 2004).





**Figura 50.** Esquema del procediment seguit per a l'experiment d'entrecruament amb el *ProFound™ Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit* (Pierce).



**Figura 51.** Activitat NFκB (%) observada als assaigs d'activació incubant cèl·lules HEK293T que expressaven HA-Nod2 amb diferents concentracions de MDP, MDP-XL i MTP-XL. (\*) El valor inferior a l'esperat observat per a la incubació amb 100 ng/mL de MDP-XL es va atribuir a un error experimental.

Per a dos tots compostos derivatitzats es va comprovar una capacitat d'activació del NF- $\kappa$ B similar a la del lligand natural, MDP. A continuació es va procedir a incubar els cultius cel.lulars amb MDP-XL o MTP-XL aplicant llum UV a diferents temps d'incubació per posteriorment aïllar el compost resultant dels lisats cel.lulars per incubació amb estreptavidina-agarosa. Igual que en el cas anterior, es va observar unió inespecífica tant a l'agarosa, com posava de manifest la presència d'una banda als controls no s'hi havia afegit MDP-XL ni MTP-XL, com a les mostres obtingudes a partir de les proteïnes emprades com a control negatiu (Figura 52).



**Figura 52.** Anàlisi per *Western-blot* corresponent als assaigs d'incubació amb MDP-XL (0,5  $\mu$ g/mL, 2 h) de cultius cel.lulars que expressaven HA-Nod2 (1-4) o HA-Nod2 $\Delta$ LRR (5-8). 1, 2, 5 i 6: controls negatius, on no s'hi va afegir MDP-XL als cultius cel.lulars. Es van analitzar les solucions resultants de la incubació amb la estreptavidina-agarosa (2, 4, 6 i 8) així com els lisats inicials (1, 3, 5 i 7).

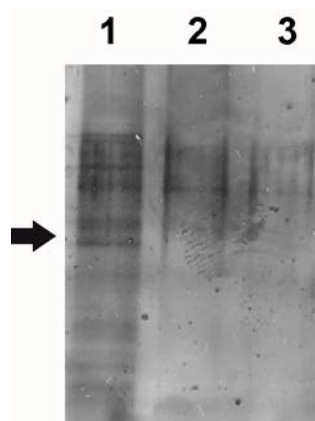
#### 4.3. Cribratge bioquímic mitjançant cromatografia d'afinitat.

##### 4.3.1. Assaigs de purificació per cromatografia d'afinitat emprant columnes MDP-agarosa i MTP-agarosa.

Com estratègia alternativa als assaigs descrits als apartats anteriors, es va plantejar l'aïllament de la o les proteïnes involucrades en el reconeixement del MDP mitjançant cromatografia d'afinitat emprant columnes de MDP-agarosa o bé de MTP-agarosa. Aquesta aproximació havia estat emprada anteriorment al laboratori del Prof. Núñez per tal de determinar proteïnes capaces d'interaccionar amb Nod2 i havia permès la identificació d'Erbin com a un regulador de la via de senyalització de Nod2 (McDonald et al., 2005). En aquest treball, per dur a terme un cribratge bioquímic per tal de determinar proteïnes capaces d'interaccionar amb Nod2, s'havia generat una línia HEK293 que expressava la proteïna de fusió TAP-Nod2 (HEK293:TAP-Nod2). Els complexos que contenien Nod2 es purificaren dels lisats cel.lulars anteriors per cromatografia d'afinitat. Les proteïnes purificades es van eluir de la columna d'afinitat, es van digerir amb tripsina i es van analitzar per espectrometria de masses (HPLC-MS/MS). Com a control es va emprar una línia HEK293 que expressava únicament TAP, que es va processar de forma equivalent, per tal d'avaluar la unió no específica de proteïnes al llarg del procés de purificació. Les proteïnes candidates es van determinar per comparació del perfil peptídic obtingut a partir de les

purificacions dels lisats HEK293:TAP-Nod2 i HEK293:TAP. Només es van considerar com a candidates les proteïnes identificades per múltiples pèptids diferents i que únicament eren detectades a partir de les preparacions de HEK293:TAP-Nod2. Així, Erbin va ser identificada per 7 pèptids diferents distribuïts al llarg de tota la seqüència de la proteïna. Aquesta interacció específica entre Nod2 i Erbin va ser confirmada per coimmunoprecipitació i per assaigs de doble híbrid (*yeast two-hybrid assays*) (McDonald, 2005).

Per tal de determinar les proteïnes que constituïrien el complex de reconeixement del MDP, es va procedir de forma similar, per aplicació de lisats cel.lulars HEK293T:HA-Nod2 a columnes d'afinitat, que contenien MDP o MTP immobilitzats covalentment sobre un suport d'agarosa (*AminoLink Plus Coupling gel*, Pierce). Així, lisats cel.lulars que provenien de cultius de cèl.lules HEK293T que expressaven de forma estable HA-Nod2, es van aplicar sobre les columnes d'afinitat de MDP- o MTP-agarosa i es van incubar durant una nit a 4 °C. Després de successius rentats amb tampons d'elevada força iònica, les proteïnes que restaven unides es van eluir emprant tampons que contenien MDP o LL-MDP (Chen, 2005), isòmer incapaç d'activar Nod2 (Girardin, 2003). Alíquotes d'aquests eluats així com d'una columna control, sense MDP o MTP, es van analitzar per electroforesi. Tant per a la columna MDP-agarosa com per a la MTP-agarosa es va observar la presència de bandes específiques al carril corresponent a l'elució amb el tampó que contenia MDP (Figura 53), que no eren presents ni a la mostra corresponent a l'elució amb tampó que contenia el lligand LL-MDP ni al de la columna control d'agarosa sense MDP/MTP.



**Figura 53.** Electroforesi SDS-PAGE revelada per tinció amb plata de solucions provinents de l'elució de columnes de MTP-Agarosa (1 i 2) o d'una columna control d'agarosa sense MTP (3) amb tampó que conté 100 µM MDP (1 i 3) o 100 µM LL-MDP (2). Totes les columnes havien estat incubades amb lisats de cultius cel.lulars HEK293T:HA-Nod2.

Per limitacions de temps a l'estada al laboratori del Prof. Nuñez no es va poder anar més enllà en la identificació d'aquestes proteïnes que potencialment podrien participar al reconeixement del MDP per Nod2. En aquell grup de recerca es continua l'estudi d'aquestes mostres per tal per confirmar els resultats preliminars obtinguts i determinar a quines proteïnes corresponen.

#### **4.3.2. Purificació per cromatografia d'afinitat emprant columnes d'afinitat FLAG-LRR. Clonatge, expressió i purificació de FLAG-Nod2LRR i FLAG-Nod2L1007fs LRR.**

Un altre mètode per identificar proteïnes requerides per a la detecció del MDP per Nod2 consistiria en determinar les proteïnes que interaccionen amb el domini responsable del reconeixement de lligands, domini LRR C-terminal, de Nod2. En aquesta aproximació, els LRRs de Nod2 serien expressats a cèl·lules de mamífer HEK293T en forma de proteïna de fusió amb l'epítot FLAG (FLAG-LRR) i purificats amb una columna d'afinitat que contindria l'anticòs anti-FLAG. Les proteïnes unides a la columna es rentarien de forma exhaustiva sota condicions astringents per tal d'eliminar les proteïnes retingudes de forma no específica, amb el que s'obtidria una columna d'afinitat FLAG-LRR. A continuació, lisats cel·lulars provinents de cèl·lules de macròfag estimulades amb MDP, s'aplicarien sobre aquesta columna d'afinitat FLAG-LRR, es rentarien i la FLAG-LRR juntament amb les proteïnes que hi estiguessin interaccionant s'eluirien de la columna emprant el pèptid FLAG. De forma equivalent a l'experiment descrit a l'apartat anterior, les proteïnes així eluïdes es separarien per electroforesi SDS-PAGE. Com a control per a la unió específica al LRR de Nod2, es prepararien columnes a partir de FLAG-LRR derivat del mutant de Nod2 associat a la malaltia de Crohn L1007fs, que no respon a l'activació amb MDP, així com amb l'efector de *Yersinia* YopM, proteïna que consta únicament de LRRs. Els resultats obtinguts per a aquestes columnes control es compararien amb els de la columna FLAG-LRR, de forma que es procediria a la identificació per HPLC-MS/MS de les proteïnes eluïdes específicament d'aquesta. Finalment s'avaluaria la seva capacitat per interaccionar amb la Nod2 sencera, amb el MDP, així com els seus efectes en l'activació de NF- $\kappa$ B.

El primer pas per dur a terme aquesta aproximació era disposar de les proteïnes FLAG-Nod2LRR i FLAG-Nod2L1007fsLRR. Per tant, es va procedir a clonar el domini per a la proteïna salvatge així com pel mutant Nod2L1007fs, que no és capaç de respondre al MDP. Així, es va amplificar per PCR els fragment dels gens corresponent

a les seqüències dels dominis LRR emprant com a ADN motlle les seqüències de la Nod2 salvatge així com la del mutant. A continuació es van subclonar aquests dominis al vector d'expressió eucariota pcDNA3. Simultàniament es va introduir a l'extrem *N*-terminal la seqüència peptídica FLAG, que permetria la posterior purificació de les proteïnes sobreexpressades per cromatografia d'afinitat emprant FLAG-agarosa. El cribratge per PCR i per digestió amb enzims de restricció dels clons generats, va permetre identificar els que contenien els fragments desitjats, la seqüència dels quals es va confirmar per seqüenciació. A continuació es van dur a terme assaigs preliminars d'expressió a cèl.lules HEK293T. Diferents cultius monocapa d'aquestes cèl.lules es van transfectar amb les construccions que contenien l'epítip FLAG corresponents als dominis LRR de Nod2 i Nod2L1007fs. Posteriorment es van aïllar les proteïnes de fusió recombinants del lisat cel.lular per purificació per afinitat emprant FLAG-agarosa. La proteïna eluïda emprant també que contenia el pèptid FLAG, es detectava per *Western-blot* emprant un anticòs monoclonal anti-FLAG (Figura 54). Es va comprovar l'expressió i purificació de FLAG-LRRNod2 i FLAG-LRRNod2L1007fs.



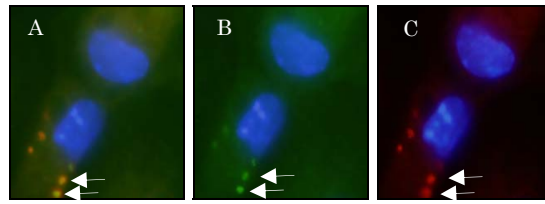
**Figura 54.** Assaigs d'expressió i purificació de FLAG-Nod2LRR a partir de lisats de cultius cel.lulars de HEK293T transformats amb pcDNA3(FLAG-Nod2LRR). Revelat per *Western-blot* emprant un anticòs monoclonal anti-FLAG d'alíquotes del lisat cel.lular de partida (1), rentats de l'agarosa (2), proteïna eluïda (3), i proteïna retinuda a l'agarosa posteriorment a l'etapa d'elució (4).

#### 4.4. Localització cel.lular del MDP.

Per tal d'optimitzar els resultats dels assaigs anteriors de purificació emprant columnes d'afinitat, es va procedir a realitzar assaigs per tal de determinar la localització subcel.lular del MDP incorporat per les cèl.lules. Determinar la localització subcel.lular del MDP permetria enriquir la mostra de partida en les proteïnes fisiològicament rellevants per al reconeixement del MDP mitjançant un fraccionament subcel.lular. Per dur a terme aquests estudis, es va procedir a incubar cèl.lules amb MDP marcat fluorescentment (MDP-FITC, cedit per Geert-Jan Boons, Universitat de Georgia), que posteriorment es van analitzar per microscòpia de fluorescència confocal. Val a dir que assaigs d'activació de NFκB, equivalents als descrits anteriorment per al MDP-XL i MTP-XL, havien posat de manifest la capacitat del

MDP-FITC d'activar la via de senyalització de Nod2. Així, en primer lloc es va procedir a fer cultius de cèl.lules de macròfag obtingudes a partir de la medul.la òssia de ratolins de genotip salvatge per Nod2 (Chamaillard et al., 2003). Els cultius es van fer a plats de 24 pous, a una concentració de  $1-2,5 \cdot 10^5$  cèl.lules/ pou. A continuació es van dur a terme incubacions a 37 °C a diferents temps (30 min, 3 h i O/N) amb el derivat fluorescent MDP-FITC (verd). Es van fer diferents bateries d'experiments. Així, part dels cultius es van sotmetre a un pretractament amb LPS (lipopolisacàrid) i TNF $\alpha$  24 h abans de dur a terme l'experiment, per tal d'estimular la captació del MDP (Kovayashi, 2004). Aquest estímul inflamatori permetia augmentar els nivells d'expressió de Nod2 a les cèl.lules, facilitant la detecció del seu lligand fluorescent. Igualment, per tal determinar si el MDP era captat per un mecanisme d'endocitosi que involucrava la formació de vesícules endocítiques, les cèl.lules es van sotmetre a incubacions amb els marcadors de lisosomes i endosomes, *Lysotracker Red DND-99* (vermell) o *Texas Red Ovoalbuina* (vermell). En aquest sentit, part de les cèl.lules es van incubar amb partícules de Dextran-fluoresceïna (verd), que es coneix que és captat per les cèl.lules per mecanismes d'endocitosi (Tansey, 1998) o es van sotmetre a un pretractament amb citocalasina D, producte que bloqueja l'endocitosi (Makoveichuk, 2004). Les cèl.lules es van tenyir addicionalment amb DAPI (blau), marcador específic del nucli cel.lular i es van fixar amb paraformaldehid. L'observació al microscopi de fluorescència confocal de les mostres resultants (Figura 55) va revelar la presència de vesícules on colocalitzaven el color verd, color indicatiu de la presència del MDP-FITC, i el vermell, corresponent als lisosomes o endosomes que havien captat els marcadors *Lysotracker Red DND-99* o *Texas Red Ovoalbuina*. Igualment es va observar que la captació del MDP-FITC era parcialment bloquejada pel tractament previ amb citocalasina D.

Aquests resultats preliminars suggerien que el MDP era captat per les cèl.lules de macròfag emprant la via endocítica i que es localitzava als lisosomes, com posava de manifest la presència de vesícules de color groc (A), resultant de la superposició del MDP-FITC, verd (B), amb la tinció en vermell corresponent al *Lysotracker* (C), reactiu específic per aquest compartiment cel.lular. Per tal de confirmar aquests resultats, així com per determinar la possible localització del MDP a altres compartiments subcel.lulars, s'haurien de dur a terme assaigs de tinció amb marcadors específics per a diversos orgànuls com l'Ab anti-LAMP-1, marcador d'endosoma tardà i lisosoma, Ab anti-Bip, específic del reticle endoplàsmic, o *Mitotracker*, reactiu que tenyeix específicament la mitocòndria.



**Figura 55.** Localització del MDP a lisosomes de macròfags. Imatges de fluorescència confocal corresponents a un cultiu de cèl.lules de macròfag de ratolí incubades amb MDP-FITC (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3 h , 37°C,verd), marcador de lisosomes Lysotracker (vermell), i on els nuclis estan tenyits amb DAPI (blau). Les cèl.lules havien estat preestimulades amb LPS (10  $\text{ng}/\text{mL}$ , 30 min, 37°C).





## V. CONCLUSIONS



Estudi de la interacció entre citocrom c i Apaf-1:

- S'han generat i caracteritzat mitjançant diferents tècniques espectroscòpiques, els mutants derivats de YCit,  $\Delta/K27M$ ,  $\Delta/A7K/K27M$ ,  $\Delta/P25K/K27M$ ,  $\Delta/A7K/P25K/K27M$ , que incorporen mutacions que aproximaven la seva seqüència a la del HHCit c. S'ha analitzat la capacitat d'aquests mutants per interaccionar amb l'Apaf-1, mitjançant un assaig de polarització de la fluorescència. Per tal de dur a terme aquest assaig, s'ha obtingut igualment el derivat fluorescent del Cit c, Zn-HHCit c. S'ha analitzat la seva capacitat per induir la formació d'un apoptosoma actiu, mitjançant assaigs *in vitro* de reconstitució de l'apoptosoma i d'activació de la caspasa-3.

Per al mutant  $\Delta/A7K/P25K/K27M$ , s'ha determinat que les mutacions introduïdes a la seqüència del YCit c són capaces d'induir la seva capacitat per interaccionar amb el Cit c, però no són suficients per induir la formació d'un apoptosoma actiu, el que indicaria el requeriment de tots els residus reportats com a components de l'epítip d'interacció entre el Cit c i l'Apaf-1, per a la formació d'un apoptosoma actiu.
- S'han generat i caracteritzat hemopèptids derivats dels mutants de YCit c, HP-5-27 i HP7K25K 1-27, per degradació química amb BrCN. S'ha determinat la seva capacitat per modular l'activitat de l'apoptosoma, mitjançant assaigs *in vitro* de reconstitució de l'apoptosoma i assaigs d'activació de la caspasa-9. Per a cap dels pèptids analitzats s'ha pogut establir una capacitat inductora de l'activació de la caspasa-9. No obstant, per a l'hemopèptid HP7K25K (1-27) s'ha determinat una potencial capacitat inhibidora de l'apoptosoma, si bé aquesta resulta enmascarada per l'efecte oxidatiu del grup hemo. No ha estat possible discernir si la inhibició observada va ser deguda a un efecte o l'altre o la suma de tots dos.
- S'han obtingut construccions de menor entitat molecular derivades de l'Apaf-1-XL emprant un sistema procariota d'expressió. En concret, s'han posat a punt les condicions d'expressió a *E. coli* i posterior purificació, de les construccions derivades de l'Apaf-1-XL, Apaf-1-XL(1-570) i Apaf-1-XL(1-572), corresponents als dominis CARD/(NOD/CED-4), i Apaf-1-XL(583-1248) i Apaf-1-XL(570-1247), corresponents al domini WDR. Per a la construcció Apaf-1-XL(583-1248)

s'han determinat les condicions requerides per renaturalitzar la proteïna, expressada en forma de cossos d'inclusió. Per a totes les proteïnes recombinants generades s'ha pogut establir la seva funcionalitat, mitjançant un assaig de reconstitució de l'apoptosoma *in vitro*, per a les construccions corresponents al fragment *N*-terminal, i de polarització de la fluorescència, per a les corresponents al fragment *C*-terminal. Els problemes observats durant la seva producció, derivats principalment de la formació dels esmentats cossos d'inclusió, que són difícils de solubilitzar i renaturalitzar, fan difícil pensar en aquestes construccions com una alternativa a la utilització de l'Apaf-1 nativa als assaigs d'avaluació de molècules amb potencial capacitat per modular l'apoptosi.

Estudi de la interacció entre muramil dipèptid i Nod2:

- Assaigs d'immunoprecipitació han indicat una interacció no directa entre el derivat del peptidoglicà de la paret bacteriana, muramil dipèptid, i Nod2. Mitjançant assaigs de purificació per cromatografia d'afinitat i posterior anàlisi per cromatografia de masses de les proteïnes específicament retengudes a la resina activada amb muramil dipèptid, s'han determinat components potencials del complex de reconeixement del muramil dipèptid, responsable de l'activació de la via de senyalització de Nod2.
- Estudis preliminars de localització subcel.lular del muramil dipèptid, han indicat que aquest seria incorporat per les cèl.lules de macròfag a través de la via endocítica.

## VI. BIBLIOGRAFIA



- Abdullaev, Z.K., Bodrova, M.E., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., Kluck, R.M., Pereverzev, M.O., Arsiniev, A.S., Efremov, R.G., Kirpichnikov, M.P., Morkhova, E.N., Newmeyer, D.D., Roder, H. and Skulachev, V.P. (2002) A cytochrome c mutant with high electron transfer and antioxidant activities but devoid of apoptogenic effect. *Biochem. J.*, **362**, 749-754.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. and Akey, C.W. (2002) Three-Dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, **9**, 423-432.
- Adams, P.A., Baldwin, D.A. and Marques, H.E. (1996) The hemopeptides from cytochrome c: preparation, physical and chemical properties, and their use as model compounds for the hemoproteins. In Scott, R.A. and Mauk, A.G. (eds.), *Cytochrome c. A multidisciplinary approach*. University science books, Sausalito, pp. 635-693.
- Adrain, C., Slee, E.A., Harte, M.T. and Martin, S.J. (1999) Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem*, **274**, 20855-20860.
- Agostini, L. (2004) NALP3 forms an IL-1-beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, **20**, 319-325.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 499-511.
- Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D.C. (1997) A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.*, **3**, 917-921.
- Anni, H., Vanderkooi, J.M. and Mayne, L. (1995) Structure of Zinc-substituted cytochrome c: nuclear magnetic resonance and optical spectroscopic studies. *Biochemistry*, **34**, 5744-5753.
- Antonini, E., Brunori, M., Caputo, A., Chiancone, E., Rossi Fanelli, A. and Wyman, J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 284.
- Aravind, L., Dixit, V.D. and Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*, **291**, 1279-1284.
- Arnold, P.A., Shelton, W.R. and Benson, D.R. (1997) Peptide helix induction in a self-assembling hemoprotein model. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3181-3182.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seiman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995) *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.
- Baistrocchi, P., Banci, L., Bertini, I., Turano, p., Bren, K.L. and Gray, H.B. (1996) Three-dimensional solution structure of *Saccharomyces cerevisiae* reduced iso-1-cytochrome c. *Biochem.*, **35**, 13788-13796.
- Barnich, N. (2005) GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 25876-25882.
- Beere, H.M. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-induced heat shock protein pathways. *J. Clinical Invest.*, **115**, 2633-2639.
- Beere, H.M. and Grenn, D.R. (2001) Stress management- heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **11**, 6-10.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. and Green, D.R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, **2**, 469-475.

- Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. and Nunez, G. (2000) Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem*, **275**, 8461-8468.
- Bjorndal, B., Trave, G., Hageberg, I., Lillehaug, J.R. and Raae, A. (2003) Expression and purification of receptor for activated C-kinase 1 (RACK-1). *Protein Expr. Purif.*, **31**, 47-55.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Boehning, D., Patterson, R.L., Sedaghat, L., Glebova, N.O., Kurosaki, T. and Snyder, S.H. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 1051-1061.
- Bouillet, P.A. and Strasser, A. (2002) BH3-only-proteins- evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell. Sci.*, **115**, 1567-1574.
- Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S. and Cohen, G.M. (2001a) Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J*, **20**, 998-1009.
- Bratton, S.B., Walker, G.D., Cain, K. and Cohen, G.M. (2001b) Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an 30 kDa fragment that associates with inappropriately oligomerized and biologically inactive similar to 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.*, **8**, 425-433.
- Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E. and LaBaer, J. (2002) Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 2654-2659.
- Brayer, G.D. and Murphy, M.E.P. (1996) Structural studies of eukariotic cytochromes c. In Scott, R.A. and Mauk, A.G. (eds.), *Cytochrome c: A multidisciplinary approach*. University Science Books, Sausalito, pp. 103-166.
- Brenner, C. and Kroemer, G. (2000) Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators [comment]. *Science*, **289**, 1150-1151.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **77**, 71-94.
- Brune, B., Gotz, C., Messmer, U.K., Sandau, K., Hirvonen, M.R. and Lapetina, E.G. (1997) Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 7253-7258.
- Bryant, C. and Stellwagen, E. (1984) Deletion of the terminal sequences from cytochromes c. *J. Biol. Chem.*, **260**, 332-336.
- Cain, K., Bratton, S. and Cohen, G. (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochemie*, **84**, 203-214.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M. and Cohen, G.M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*, **275**, 6067-6070.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C. and Cohen, G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, **274**, 22686-22692.
- Cain, K., Langlais, C., Sun, X., Brown, D. and Cohen, G. (2001) Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41985-41990.
- Cammers-Goodwin, A., Allen, T.J., Oslick, S.L., McClure, K.F., Lee, J.H. and Kemp, D.S. (1996) Mechanism of stabilization of helical conformations of polypeptides by water containing trifluoroethanol. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3082-3090.
- Carrió, M.M. (2002) Atragació i desatragació proteica en *Escherichia coli*: Biologia dels cossos d'inclusió. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.



- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-862.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Wu, Q., Daata, P., Alnemri, E.S. and Shi, Y. (2001) Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*, **104**, 769-780.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G. and Inohara, N. (2003) An essential role for Nod1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunology*, **4**, 702-707.
- Chang, D.W., Ditsworth, D., H., L., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. and Yang, X.L. (2003) Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and may inflammatory caspases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16466-16469.
- Chen, D., Duggan, C., Reden, T.B., Kooragayala, L.M., Texada, D.E. and Langford, M.P. (2004) Calreticulin is a binding protein for muramyl dipeptide and peptidoglycan in RK13 cells. *Biochemistry*, **43**, 11796-11801.
- Chen, D., Texada, D.E., Duggan, C., Liang, C., Reden, T.B., Kooragayala, L.M. and Langford, M.P. (2005) Surface Calreticulin Mediates Muramyl Dipeptide Induced Apoptosis in RK13 cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 22425-22436.
- Chereau, D., Zou, A., Spada, A. and Wu, J.C. (2005) A nucleotide binding site in caspase-9 regulates apoptosome activation. *Biochemistry*, **44**, 4971-4976.
- Chipuk, J.E., Mauer, U., Green, D.R. and Schuler, M. (2004) Direct activation of BAX by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Colangeli, R., Heijbel, A., Williams, A.M., Manca, C., Chan, J., Lyashcheko, K. and Gennaro, M.L. (1998) Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Chromatography B*, **714**, 223-235.
- Concannon, G.C., Orrenius, S. and Samuli, A. (2001) Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both procaspase 3 and cytochrome c. *Gene Expr.*, **9**, 195-201.
- Corradin, G. and Harbury, H.A. (1970) Cleavage of cytochrome c with cyanogen bromide. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 489-496.
- Cristoni, S. and Bernardi, R. (2003) Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. *Mass Spectrom Rev*, **22**, 369-406.
- Crompton, M. (1999) The permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.*, **341**, 233-249.
- Damiano, J.S. (2004) Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem. J.*, **381**, 213-219.
- Daniel, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
- Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C. and Guner, D. (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem.*, **39**, 73-88.
- Davis, N.C. and Smith, E.L. (1956) Purification and some properties of prolidase of swine kidney. *J. Biol. Chem.*, **224**, 261-275.
- Day, C.L., Dupont, C., Lackmann, M., Vaux, D.L. and Hinds, M.G. (1999) Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1. *Cell Death Diff.*, **6**, 1125-1132.

- de Bernardez Clark, E., Schwartz, E. and Rudolph, R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol.*, **309**, 217-236.
- Delhalle, S., Duvoix, A., Schnekenburger, M., Morceau, F., Dicato, M. and Diederich, M. (2003) An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1010**, 1-8.
- Desagher, S. and Martinou, J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biol.*, **10**, 369-377.
- Dopner, S., Hildebrant, P.R., F. and Mauk, A.G. (1998) Alkaline conformational transitions of ferricytochrome c studied by resonance raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11246-11255.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Duewel, H.S. and Honek, J.F. (1998) CNBr/Formic acid reactions of methionine- and trifluoromethionine-containing lambda lysozyme: probing chemical and positional reactivity and formulation side reactions by mass spectrometry. *Journal of Protein Chemistry*, **7**, 337-350.
- Dumont, M.E., Corin, A.F. and Campbell, G.A. (1994) Noncovalent binding of heme induces a compact apocytochrome c structure. *Biochemistry*, **33**, 7368-7378.
- Dumont, M.E. and Sherman, J.F. (1988) Coupling of hemo attachment to import of cytochrome c into yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 15928-15937.
- Dyson, H.J. and Beattie, J.K. (1982) Spin state and unfolding equilibria of Ferricytochrome c in acidic solutions. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2267-2273.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell*, **44**, 817-829.
- English, A.M. and Cheung, E. (1992) *Inorg. Chim. Acta*, **201**, 243.
- Fadeel, B., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (1999) Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **266**, 699-717.
- Fearnhead, H.O. (2001) Cell-free systems to study apoptosis. *Methods Cell. Biol.*, **66**, 167-185.
- Fearnhead, H.O., McCurrach, M.E., O'Neill, J., Zhang, K., Lowe, S.W. and Lazebnik, Y.A. (1997) Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug resistant cells. *Genes Dev.*, **11**, 1266-1276.
- Fiocchi, C. (1998) Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, **115**, 182-205.
- Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K. (2005) New approaches and therapeutics targeting apoptosis and disease. *Pharmacol. Rev.*, **57**, 187-215.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.*, **384**, 201-232.
- Fujimoto, A., Tajeuchi, H., Taback, B., Hsueh, E.C., Elashoff, D., Morton, D.L. and Hoon, D.S. (2004) Allelic imbalance of 12q22-23 associated with Apaf-1 locus correlates with poor disease outcome in cutaneous melanoma. *Cancer Res.*, **64**, 2245-2250.
- Ganguly, C., Martin, B., Bubb, M. and Korn, E.D. (1992) Limited proteolysis reveals a structural difference in the globular head domains of dephosphorylated and phosphorylated *Acanthamoeba* Myosin II. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20905-20908.
- Gao, Y., Boyd, J., Williams, R.J.P. and Pielak, G.J. (1990) Assignment of proton resonances, identification of secondary structural elements, and analysis of backbone chemical shifts for the C102T variant of yeast iso-1-cytochrome c and horse cytochrome c. *Biochemistry*, **29**, 6994-7003.
- Garcia-Junceda, E., Shen, G.J., Sugai, T. and Wong, C.H. (1995) A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent

- aldolases: Rhamnulose-1-phosphate aldolase, Fuculose-1-phosphate aldolase and Tagatose-1,6-diphosphate aldolase. *Bioorg. Med. Chem*, **3**, 945-953.
- Geddes, B.J., Wang, L., Huang, W.J., Lavelle, M. and Manji, G.A. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **284**, 77-82.
- Genini, D., Budihardjo, I., Plunkett, W., Wang, X., Carrera, C.J., Cottam, H.B., Carson, D.A. and Leoni, L.M. (2000) Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J Biol Chem*, **275**, 29-34.
- Girardin, S.E. (2003) *J.Biol.Chem.*, **278**, 8869-8872.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. and Green, D.R. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, **2**, 156-162.
- Goto, Y., Calciano, L.J. and Fink, A.L. (1990a) Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 573-577.
- Goto, Y., Takahashi, N. and Fink, A.L. (1990b) Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry*, **29**, 3480-3488.
- Green, D.R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to death. *Cell*, **121**, 671-674.
- Gross, E. (1967) The Cyanogen Bromide Reaction. *Meth. Enzymol.*, **11**, 238-255.
- Gutierrez, O.e.a. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4812-4818.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.*, **166**, 557-580.
- Hao, Z., Duncan, G.S., Chang, C.C., Elia, A., Fang, M., Wakeman, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A. and al., e. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell*, **121**, 579-591.
- Hashimoto, M., Takeda, A., Hsu, L.J., Takenouchi, T. and Masliah, E. (1999) Role of cytochrome c as a stimulator of a-synuclein aggregation in Lewy Body disease. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28849-28852.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappa B. *Genes Dev.*, **18**, 2195-2224.
- Henderson, C.J., Aleo, E., Fontanini, A., Maestro, R., Paroni, G. and Brancolini, C. (2005) Caspase activation and apoptosis in response to proteasome inhibitors. *Cell Death Differ.*, **12**, 1240-1254.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994) *C.elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*. *Cell*, **76**, 665-676.
- Hengartner, M.O., Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H., Savill, J., Fadok, V., Krammer, P.H., Meier, P., Evan, G., Yuan, J., Yankner, B.A. and Nicholson, D.W. (2000) Nature Insight Apoptosis. *Nature*, **407**, 769-816.
- Hildebrand, D.P., Burk, D.L., Maurus, R., Ferrer, J.C., Brayer, G.D. and Mauk, A.G. (1994) The proximal ligand variant His93Tyr of Horse Heart Myoglobin. *Biochemistry*, **34**, 1997-2005.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M. and Martin, S.J. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.*, **23**, 2134-2145.
- Hisamatsu, T.e.a. (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, **124**, 993-1000.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschoop, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 155-156.

- Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nuñez, G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J*, **18**, 3586-3595.
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M. and Nunez, G. (1998a) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, **273**, 33489-33494.
- Huang, Y., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D.G. and Wu, H. (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*, **104**, 781-790.
- Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C. and Nuñez, G. (2005) NOD-LRR Proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 355-383.
- Inohara, N., Kosedo, T., Lin, J., Del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y. and Nuñez, G. (2000) An Induced Proximity Model for NF- $\kappa$ B Activation in the Nod1/RICK and RIP Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.*, **275**, 27823-27831.
- Inohara, N., Koseki, T., Del Peso, L., Hu, Y. and Yee, C. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.*, **274**, 14560-14567.
- Inohara, N. and Nuñez, G. (2001) The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene*, **20**, 6473-6481.
- Inohara, N. and Nuñez, G. (2003) NODS: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews*, **3**, 371- 382.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L. and Nuñez, G. (2003) Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J.Biol.Chem.*, **278**, 5509-5512.
- Inohara, N., Ogura, Y. and Nuñez, G. (2002) Nods:a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Op. Immunol.*, **5**, 76-80.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A. and Nunez G. (2001) Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2551-2554.
- Janbon, G., Rustchenko, E.P., Klug, S., Scherer, S. and Sherman, F. (1997) Yeast sequencing reports. Phylogenetic relationships of fungal cytochromes c. *Yeast*, **Cc11**, 985-990.
- Jia, L., Srinivasula, S.M., Liu, F., Newland, A.C., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. and Kelsey, S.M. (2001) Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c- dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood*, **98**, 414-421.
- Jiang, X., Kim, H., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S., Rosenberg, S. and Wang, X. (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- $\alpha$  in death regulatory pathway. *Science*, **299**, 223-225.
- Jiang, X. and Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, **275**, 31199-31203.
- Kapust, R.B. and Waugh, D.S. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which is fused. *Protein Sci*, **8**, 1668-1674.
- Katona, L.I., Ayalew, S., Coleman, J.L. and Benach, J.L. (2000) A bactericidal monoclonal antibody elicits a change in its antigen, OspB of *Borrelia burgdorferi*, that can be detected by limited proteolysis. *J. Immunol.*, **164**, 1425-1431.
- Keilin, D. (1930) Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, **106**, 418-444.

- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-571.
- Kim, H., Du, C., Fang, M. and Wang, X. (2005) Formation of an apoptosome is initiated by cytochrome c induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 17545-17550.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997a) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.
- Kluck, R.M., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Naiem, S., Yaffe, M.P., Margoliash, E., Bredesen, D., Mauk, A.G., Sherman, F. and Newmeyer, D.D. (2000) Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J Biol Chem*, **275**, 16127-16133.
- Kluck, R.M., Martin, S.M., Hoffman, B.M., Zhou, J.S., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997b) Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *The EMBO Journal*, **16**, 4639-4649.
- Kobayashi, T., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galan J.E., Nunez, G., Haneway, C.A., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, **416**, 194-199.
- Kobayashi, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell R.A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, **307**, 731-734.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A.I. and Tsujimoto, Y. (2003) Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, **114**, 673-688.
- Koonin, E.V. and Aravind, L. (2000) The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 223-224.
- Kroemer, G. and Martin, S.J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat. Med.*, **11**, 725-730.
- LaCasse, E., Baird, S., Korneluk, R. and Mackenzie, A. (1998) The inhibitors of apoptosis and their emerging role in cancer. *Oncogene*, **17**, 3247-3259.
- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Lademann, U., Cain, K., Gyrd-Hansen, M., Brown, D., Peters, D. and Jäättelä, M. (2003) Diarylurea compounds inhibit caspase activation by preventing the formation of the active 700-kilodalton apoptosome complex. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 7829-7837.
- Lane, D. (1998) *Antibodies, a laboratory manual*. Ed. Harlow.
- Lauber, K., Appel, H.A., Schlosser, S.F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S. (2001) The adapter protein Apaf-1 is proteolytically processed during apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 29772-29781.
- Lawen, A. (2003) Apoptosis - an introduction. *BioEssays*, **25**, 888-896.
- Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 589-598.
- Li, J.e.a. (2004) Regulation of IL-8 and IL-1 beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD mutations. *Human Molecular Genetics*, **13**, 1715-1725.
- Li, M., Su, Z. and Janson, J.C. (2004) In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.*, **33**, 1-10.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, **86**, 147-157.
- Lloyd, E., Burk, D.L., Ferrer, J.C., Maurus, R., Doran, J., Carey, P.R., Brayer, G.D. and Mauk, A.G. (1996) Electrostatic modification of the active site of myoglobin: characterization of the proximal Ser92Asp variant. *Biochemistry*, **35**, 11901-11912.
- Lockshin, R.A. and Williams, C.M. (1965) Programed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J. Insect Physiol.*, **11**, 123-133.
- Low, D. W.; Gray, H. B.; Duus, J. O. (1997) Paramagnetic NMR Spectroscopy of Microperoxidase-8, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1-5.
- Makoveichuk, E., Castel, S., Vilaró, S. and Olivecrona, G. (2004) Lipoprotein lipase-dependent binding and uptake of low density lipoproteins by THP-1 monocytes and macrophages: possible involvement of lipid rafts. *Bioch. Bioph. Acta*, **1686**, 37-49.
- Malet, G., Martin, A.G., Orzáez, M., Vicent, M.J., Masip, I., Sanclimens, G., Ferrer-Montiel, A., Mingarro, I., Messeguer, A., Fearnhead, H.O. and Perez-Paya, E. (2006) Small molecule inhibitors of Apaf-1-related caspase-3/-9 activation that control mitochondrial-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, **13**:1523-32.
- Malet, G. (2004) Identificación de moduladores del apoptosoma mediante química combinatoria. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Margoliash, E. and Frohwirt N. (1959) Spectrum of the horse-heart cytochrome c. *Biochem. J.*, **71**, 570-572.
- Margoliash, E. and Schejter, A. (1966) Cytochrome c. *Adv. Protein Chem.*, **21**, 113-286.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D. and French, D.M. (2004) *Nature*, **430**, 213-218.
- Martin, A.G. and Fearnhead, H.O. (2002) Apocytochrome c blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J.Biol. Chem.*, **52**, 50834-50841.
- Martin, A.g., Nguyen, J., Wells, J.A. and Fearnhead, H.O. (2004) Apocytochrome c inhibits caspases by preventing apoptosome formation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **319**, 944-950.
- Martin, M.C., Allan, A.A., Lickrish, M., Sampson, C., Morrice, N. and Clarke, P.R. (2005) Protein Kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J.Biol. Chem.*, **280**, 15449-15455.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory casapases and processing of proIL-beta. *Mol.Cell*, **10**, 417-426.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C. and Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.*, **187**, 1261-1271.
- Mauk, M.R., Reid, L.S. and Mauk, A.G. (1982) Spectrophotometric analysis of the interaction between cytochrome b5 and cytochrome c. *Biochemistry*, **21**, 1843-1846.
- Mayer, B. and Oberbauer, R. (2003) Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci*, **18**, 89-94.

- McDonald, C., Chen, F.F., Ollendorff, V., Ogura, Y., Marchetto, S., Lécine, S., Borg, J.P. and Nuñez, G. (2005) A role of Erbin in the regulation of Nod-2-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *J. Biol. Chem.*
- McDonald, C., Vacratsis, P.O., Bliska, J.B. and Dixon, J.E. (2003) The Yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18514-18523.
- Meier, P., Finch, A. and Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, **407**, 796-801.
- Mikolajczyk, J., Scott, F.L., Krajewski, S., Sutherlin, D.P. and Salvesen, G.S. (2004) Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry*, **43**.
- Miller, L.J. and Marx, J. (1998) Apoptosis. *Science*, **281**, 1301.
- Mochizuki, M. and Mizuno, Y. (2003) Gene therapy for Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, **65**, 205-213.
- Mock, W.L. and Liu, Y. (1995) Hydrolysis of picolinylprolines by prolidase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18437-18446.
- Moench, S.J. and Satterlee, J.D. (1989) Proton NMR comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* ferricytochrome c isozyme-1 monomer and covalent disulfide dimer. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9923-9931.
- Mukhopadhyay, A. (1997) Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Biotechnology*, **56**, 61-105.
- Murray, P.J. (2005) NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr. Op. Immunol.*, **17**, 352-358.
- Muto, A., Ruland, J., McAllister-Lucas, L.M., Lucas, P.C., Yamaoka, S., Chen, F.F., Lin, A., Mak, T.W., Nuñez, G. and Inohara, N. (2002) Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF- $\kappa$ B activation induced by phorbol ester. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31871-31876.
- Netea, M.G.e.a. (2005) Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.*, **174**, 6518-6523.
- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M. and Reed, J.C. (1994) Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, **79**, 353-364.
- Nguyen, J.T. and Wells, J.A. (2003) Direct activation of apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 7533-7538.
- Nur-E-Kamal, A., Gross, S.R., Pan, Z., Baklava, z., Ma, J. and Liu, L.F. (2004) Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 24911-24914.
- Nygren, P., Ståhl, S. and Uhlén, M. (1994) Engineering protein to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.*, **12**, 184-188.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J., Steven, R.B., Bayless, T.M., Kischner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G. and Cho, J.H. (2001a) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 603-606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S. and Nuñez, G. (2001b) Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4812-4818.
- Olteanu, A., Patel, C.N., Dedmon, M.M., Kennedy, S., Linhoff, M.W., Minder, C.M., Potts, P.R., Deshmukh, M. and Pielak, G.J. (2003) Stability and apoptotic activity of recombinant human cytochrome c. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **312**, 733-740.

- Opitz, B. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptor for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36426-36432.
- Orrenius, S. (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters*, **149**, 19-23.
- Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Kharbanda, S. (2000a) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, **19**, 1975-1981.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V. and al., e. (2000b) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.*, **19**, 4310-4322.
- Pathan, N., Marusawa, H., Krajewska, M., Matsuzawa, S., Kim, H., Okada, K., torii, S., Kitada, S., Krajewski, S., Welsh, K., Pio, F., Godzik, A. and Reed, J.C. (2001) TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32230-32229.
- Pelletier, H. and Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. *Science*, **258**.
- Pollock, W.B.R., Rosell, F.I., Twitchett, M.B., Dumont, M.E. and Mauk, A.G., (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome c. Trimethylation of Lys72 in yeast iso-1-cytochrome c and the alkaline conformational transition. *Biochemistry*, **37**, 6124-6131.
- Purdie, N. and Swallows, K.A. (1990) Circular dichroism-I. Theory and practice. *Trends Anal. Chem.*, **9**, 94-97.
- Purring, C., Zou, H., Wang, X. and Mc Lendon, G. (1999) Stoichiometry, free energy, and kinetic aspects of cytochrome c: Apaf-1 binding in apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7435-7436.
- Purring-Koch, C. and McLendon, G. (2000) Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11928-11931.
- Qin, H., Srinivasula, S.M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. and Shi, Y. (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor-1. *Nature*, **399**, 549-557.
- Radzicka, A. and Wolfenden, R. (1991) Analogues of intermediates in the action of pig kidney prolidase. *Biochemistry*, **30**, 4160-4164.
- Raff, M. (1998) Cell suicide for Beginners. *Nature*, **396**, 119-122.
- Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R. and Shi, Y. (2005) Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ATP. *Nature*, **434**, 926-933.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, **104**, 791-800.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, **13**, 3179-3184.
- Roy, N., Mahadevan, M.S., cLean, M., Shutler, G. and Yaraghi, Z. (1995) *Cell*, **80**, 167-178.
- Sakamoto, S., Sakurai, S., Ueno, A. and Mihara, H. (1997) Haem binding and catalytic activity of two- $\alpha$ -helix peptide annealed by trifluoroethanol. *Chem. Commun.*, 1221-1222.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R. and Alnemri, E.S. (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, **274**, 17941-17945.



- Salgado, J., García-Sáez, A.J., Malet, G., Mingarro, I. and Pérez-Payá, E. (2002) Peptides in apoptosis research. *J. Peptide Sci.*, **8**, 543-560.
- Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 401-410.
- Saxena, K., Gaitatzes, C., Walsh, M.T., Eck, M., Neer, E. and Smith, T.F. (1996) Analysis of the physical properties and molecular modeling of Sec13: a WD Repeat protein involved in vesicular traffic. *Biochemistry*, **35**, 15215-15221.
- Schenkein, I., Franklin, E.C. and Frangione, B. (1981) Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary gland: a partial sequence and demonstration of spontaneous cleavage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 57-62.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.
- Shy, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, **9**, 459-470.
- Skulachev, V.P. (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, **423**, 275-280.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 181-185.
- Soengas, M.S., Alarcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W. and Lowe, S.W. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, **284**, 156-159.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C. and Lowe, S.W. (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, **409**, 207-211.
- Sprague, E.R., Reed, M.J., Johnson, A.D. and Wolberger, C. (2000) Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. *EMBO J.*, **19**, 3016-3027.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, **1**, 949-957.
- Srinivasula, S.M., Hedge, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J. and al., e. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/Diablo regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, **410**, 112-116.
- Steimle, V., Otten, L.A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993) *cell*, **75**, 135-146.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. and Salvesen, G.S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, **274**, 8359-8362.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 217-245.
- Sulston, J.E. (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B. Biol. Sci.*, **275**, 287-297.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, R.P., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J. and al., e. (1999) NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*, **401**, 818-822.
- Suto, D., Sato, K., Ohba, Y., Yoshimura, T. and Fujii, J. (2005) Suppression of the proapoptotic activity of cytochrome c by single oxygen via a heme redox state-independent mechanism. *Biochem. J.*
- Takatani, T., Takahashi, K., Uozumi, Y., Shikata, E., Yasuhiro, Y., Ito, T., Matsuda, T., Schaffer, S.W., Fujio, Y. and Azuma, J. (2004) Taurine inhibits apoptosis by

- preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, 949-953.
- Tamm, I., Trepel, M., Cardo-Vila, M., Sun, Y., Welsh, K., Cabezas, E., Swatterthwait, A., Arap, W., Reed, J.C. and Pasqualini, R. (2003) Peptides targeting caspase inhibitors. *J.Biol. Chem.*, **278**.
- Tanabe, T., Chamailard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M.M., Tromp, G., Williams, C.J., Inohara, N. and Núñez, G. (2004) Regulatory critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.*, **23**, 1587-1597.
- Tansey, F.A. and Cammer, W. (1998) Differential uptake of dextran beads by astrocytes, macrophages and oligodendrocytes in mixed glial-cell cultures from brains of neonatal rats. *Neuroscience Lett.*, **248**, 159-162.
- Theorell, H. and Akesson, A. (1941) Studies on Cytochrome c. II. The optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives. *J.Am.Chem.Soc.*, **63**, 1812-1827.
- Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Zhao, J.J., Howard, A.D., Griffin, P.R. and Chapman, K.T. (1994) Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry*, **33**, 3934-3940.
- Trinh, T., Jesse, J. and Blom, F. (1994) *Focus*, Vol. 16, p. 78.
- Tschopp, J., Martinon, F. and Burns, D. (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 95-104.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-1443.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. and Arakawa, T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, **28**, 1-8.
- Turner, D.L., Brennan, L., Chamberlin, S.G., Louro, R.O. and Xavier, A.V. (1998) *Eur. J. Biophys.*, **27**, 367-375.
- Twiddy, D., Brown, D.G., Adrain, C., Jukes, R., Martin, S., Cohen, G.M., MacFarlane, M. and Cain, K. (2004) Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J. Biol. Chem.*, **279**, 19665-19682.
- Twomey, C. and McCarthy, J.V. (2005) Pathways of apoptosis and importance in development. *J. Cell. Mol. Med.*, **9**, 345-359.
- Vanderkooi, J.M., Adar, F. and Erecinska, M. (1976) Metallocytochromes c: characterization of electronic absorption and emission spectra of Sn<sup>4+</sup> and Zn<sup>2+</sup> cytochromes c. *Eur. J. Biochem.*, **64**, 381-387.
- Vanderkooi, J.M. and Erecinska, M. (1975) Cytochrome c interaction with membranes. Absorption and emission spectra and binding characteristics of iron-free cytochrome c. *Eur. J. Biochem.*, **60**, 199-207.
- Vanderkooi, J.M., Landesberg, R., Hayden, G. and Owen, C.S. (1977) Metal-free and metal-substituted cytochromes c. Use in characterization of the cytochrome c binding site. *Eur. J. Biochem.*, **81**, 339.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. and Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, **258**, 1955-1957.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Kauffmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2002) Htra2 promotes cell death through its serine activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 445-454.

- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.*, **84**, 627-639.
- Vogt, C. (1842) Untersuchungen über die entwicklungsgeschichte der geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Solothurn*.
- Vorm, O., Roepstorff, P. and Mann, M. (1994) Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.*, **66**, 3281-3287.
- Wang, Z.B., Liu, Y.Q. and Cui, Y.F. (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol. Int.*, **29**, 489-496.
- Watanabe, T., Hirota, Y., Arakawa, Y., Fujusawa, H., Tachibana, O., Hasegawa, H., Yamashita, J. and Hayashi, Y. (2003) Frequent LOII at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. *Brain Pathol*, **13**, 431-439.
- Welinder, K.G. (1988) Generation of peptides suitable for sequence analysis by proteolytic cleavage in reversed-phase high-performance liquid chromatography solvents. *Analytical Biochemistry*, **174**, 54-64.
- Wolf, B.B., Schuler, M., Li, W., Eggers- Sedlet, B., Lee, W., Taylor, P., Fitzgerald, P., Mills, G.B. and Green, D.R. (2001) Deficiency cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34244-34251.
- Xu, Y., Bruening, M.L. and Watson, J.T. (2003) Non-specific, on probe cleanup methods for MALDI-MS samples. *Mass Spectrom Rev*, **22**, 429-440.
- Yamamoto, H., Gil, J., Schwartz, S. and Perucho, M. (2000) Frameshift mutations in Fas, Apaf-1 and Bcl-10 in gastrointestinal cancer of microsatellite mutator phenotype. *Cell Death Differ.*, **7**, 238-239.
- Yan, N., Chai, J., Lee, E.S., Gu, L., Liu, Q., He, J., Wu, J.W., Kokel, D., Li, H., Hao, Q., Xue, D. and Shi, Y. (2005) Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **437**, 831-837.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Tsung-I, P., Jones, D.P. and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Yang, L., Mashima, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sakamoto, H., Yamori, T., Oh-hara, T. and Tsuruo, T. (2003) Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer 460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res.*, **63**, 6566-6567.
- Yang, X.L., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science*, **281**, 1355-1357.
- Yoshida, H. (2003) The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. *Cell Structure and Function*, **28**, 3-9.
- Yu, T., Wang, X., Purring-Koch, C., Wei, Y. and McLendon, G.L. (2001) A mutational epitope for cytochrome C binding to the apoptosis protease activation factor-1. *J Biol Chem*, **276**, 13034-13038.
- Yu, X., Acehan, D., Menertret, J.-F., Booth, C.R., Ludtke, S.J., Riedl, S.J., Shi, Y., Wang, X. and Akey, C.W. (2005) A structure of the human apoptosome at 12.8Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure*, **13**, 1725-1735.
- Yu, X., Wang, H., Acehan, D., Wang, X. and Akey, C.W. (2006) Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the *Drosophila* Apaf-1 related killer. *J. Mol. Biol.*, **355**, 577-589.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1993) The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652.

- Zhang, R. and Snyder, G.H. (1991) Factors governing selective formations of specific disulfides in synthetic variants of  $\alpha$ -conotoxin. *Biochemistry*, **30**, 11343-11348.
- Zhou, N.E., Kay, C.M. and Hodges, R.S. (1992) Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded  $\alpha$ -helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2664-2670.
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad USA*, **96**, 11265-11270.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-11556.
- Zou, H., Yang, R., Hao, J., Sun, C., Fesik, S.W., Wu, J.C., Tomaselli, K.J. and Armstrong, R.C. (2003) Regulation of the Apaf-1/caspase-9 Apoptosome by Caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8091-8098.

## VII. APÈNDIX



### **Caracterització biofísica dels citocroms mutants.**

Tot i que el petit tamany i estabilitat del citocrom c feien pensar que les modificacions introduïdes als mutants preparats no alteraria sensiblement la seva estructura, era important disposar de proves en aquest sentit per tal de descartar que qualsevol efecte sobre la interacció amb Apaf-1 no provenia de canvis estructurals no previstos.

La introducció a la seqüència de YCit c de les mutacions considerades en aquest treball podia tenir, en principi, diferents efectes sobre l'estructura i estabilitat de les proteïnes corresponents. En primer lloc, la introducció de dos residus de Lys substituint un d'Ala i un de Pro (A7K i P25K) previsiblement modificaria localment el caràcter electrostàtic de les proteïnes. En particular, la mutació A7K suposava la introducció d'una càrrega positiva extra a la primera hèlix present al citocrom, on ja existien tres residus de Lys i un d'Arg, el que podia provocar una certa desestabilització estructural per efectes de repulsió electrostàtica. D'altra banda, els efectes de la introducció de la mutació K27M podrien anar en el sentit contrari als anteriors, en fer desaparèixer un altre residu carregat. Així mateix, els efectes estèrics podien també tenir alguna influència en l'estructura, si bé, donada la mida del citocrom i que aquests residus es trobaven relativament exposats a la superfície de la proteïna, es podia esperar que fossin menors. Finalment, els efectes de l'eliminació de cinc residus de la regió *N*-terminal del citocrom, que en la proteïna salvatge es trobaven de forma desestructurada, eren més difícils de preveure.

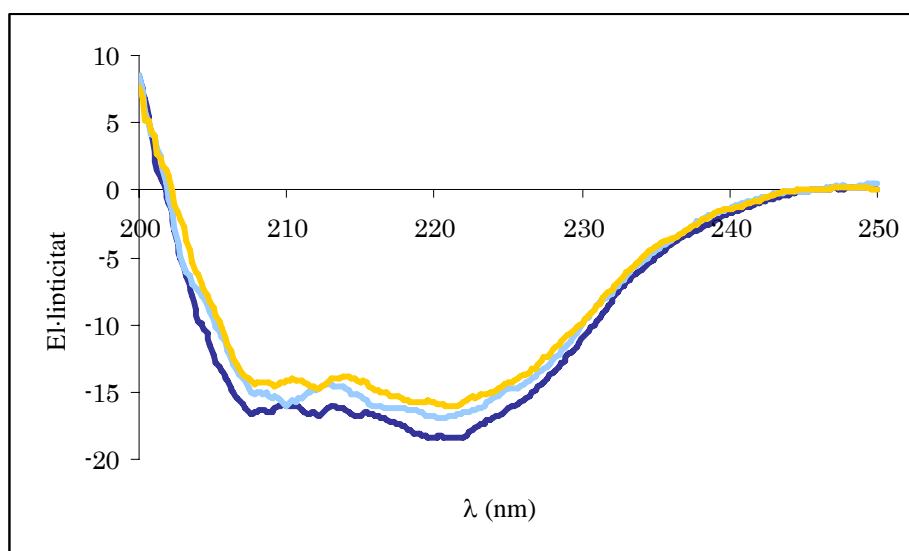
Per aquest motiu es va dur a terme una caracterització dels mutants de YCit c obtinguts emprant un ventall de tècniques espectroscòpiques.

#### **1. Estudis de dicromisme circular.**

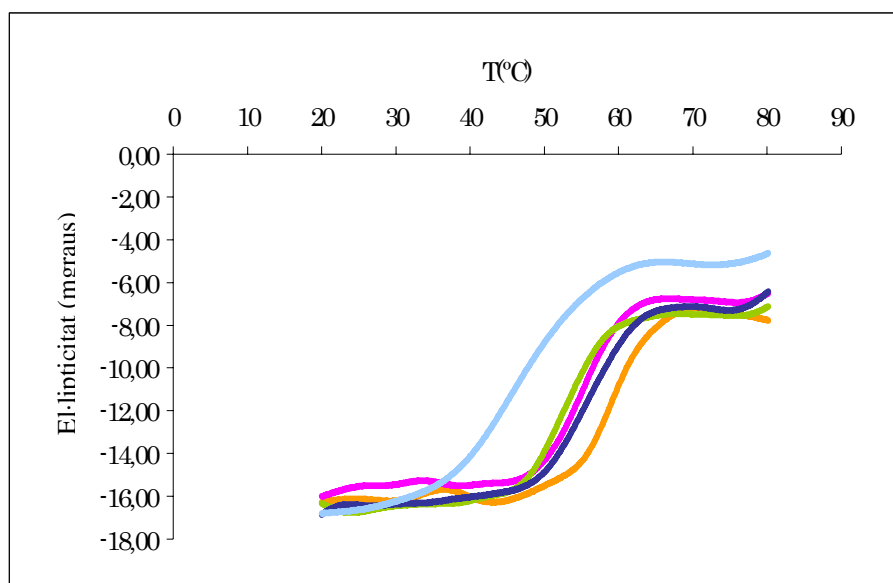
Per tal de determinar possibles alteracions estructurals i comprovar si la introducció de les mutacions havia produït canvis en la estabilitat tèrmica dels mutants de YCit c, es van enregistrar els espectres de dicromisme circular (DC) i es van determinar les respectives temperatures de fusió o desnaturalització ( $T_m$ ).

Els espectres de DC de pèptids i proteïnes depenen de la seva estructura secundària (Purdie, 1990). En aquest sentit, l'espectroscòpia de DC resulta una eina d'utilitat per determinar l'estabilitat tèrmica d'una proteïna a través de la  $T_m$ , que es defineix com aquella temperatura a la que un 50 % de la proteïna ha perdut el seu plegament. En conseqüència un valor elevat de  $T_m$  indica una major estabilitat de l'estructura de la proteïna.

Els espectres de DC enregistrats van ser gairebé superposables als del YCit c salvatge (Figura 56), i corresponien als d'una proteïna amb una estructura majoritària en forma d'hèlix  $\alpha$  (mínims a  $\sim 208$  nm i 222 nm) (Zhang, 1991), el que posava de manifest que l'estructura de la proteïna no havia patit canvis significatius per efecte de la introducció de les diferents mutacions. Els valors de  $T_m$  es van determinar enregistrant els canvis d'el·lipticitat a 220 nm en funció de la temperatura (Figura 57) i es resumeixen a la Taula 17, on també s'especifica la  $T_m$  de YCit c que es va emprar com a referència. Els valors tenen associat un error experimental de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 56.** Espectres de dicroisme circular del YCit c (—), YCit c ( $\Delta$ /P25K/K27M) (—) i YCit c ( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M) (—) enregistrats en 20 mM fosfat sòdic (25 °C).



**Figura 57.** Corbes de desnaturalització tèrmica per al YCit c (—), YCit c ( $\Delta$ ) (—), YCit c ( $\Delta$ /A7K/K27M) (—), YCit c ( $\Delta$ /P25K/K27M) (—) i YCit c ( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M) (—), enregistrades a 220 nm en 20 mM fosfat sòdic amb un gradient de temperatura de 1,5 °C/min.



**Taula 17.** Valors de T<sub>m</sub> determinats per a les diferents proteïnes derivades de YCit c.

Mutant YCit c	T <sub>m</sub> (°C)
YCit c	59
YCit c (Δ)	55
YCit c (Δ/A7K/K27M)	53
YCit c (Δ/P25K/K27M)	56
YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M)	46

El valor de T<sub>m</sub> determinat per al YCit c va ser de 59 °C, la diferència respecte el valor descrit a la bibliografia per al YCit c expressat en *E.coli*, 56,5 °C (Pollock, 1998), es va considerar atribuïble a l'error experimental de la mesura i a les diferències en els protocols emprats. Els resultats obtinguts amb els mutants Δ, Δ/A7K/K27M i Δ/P25K/K27M mostraven una disminució dels valors de T<sub>m</sub> d'entre 3 i 6 °C respecte al YCit c. Això semblava reflectir una petita disminució de l'estabilitat tèrmica d'aquestes proteïnes, però probablement no implicava que s'hagués donat una pertorbació important de la seva estructura. Com s'ha apuntat prèviament, el fet que la proteïna que presentava la mutació A7K fos la que mostrava una disminució més gran en el valor de T<sub>m</sub>, suggeria que, efectivament, la introducció d'una carrega positiva addicional en una regió que ja contenia varis residus de Lys i Arg podria jugar un paper desestabilitzador. Aquest efecte era aparentment més important en el mutant YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M), el que indicaria que els efectes de repulsió electrostàtica resultaven encara més importants.

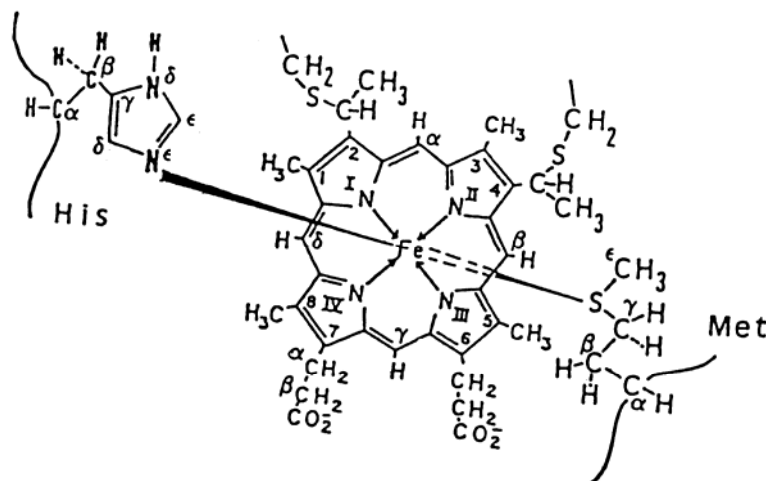
## 2. Estudi per espectroscòpia d'absorció electrònica

L'espectroscòpia d'absorció electrònica permet detectar canvis en la distribució electrònica de l'àtom de ferro del grup hemo. Aquests canvis, en general responen a variacions en l'entorn de coordinació de l'àtom metàl·lic. L'àtom de Fe del grup hemo del citocrom c en estat oxidat (Fe<sup>3+</sup>) presenta una distribució electrònica d<sup>5</sup> de spin baix deguda a la coordinació dels residus His18 i Met80 com a lligands axials (Brayer, 1996) (Figura 58). Aquesta estructura és estable dins el rang de pH 4-8, però es troba alterada quan la proteïna es sotmet a condicions de pH més extremes. En analitzar els espectres d'absorció electrònica del ferricitocrom c dins el rang de pH 0-14, Theorell i Akesson van determinar l'existència de cinc estats diferents (I - V) interconvertibles per fenòmens de

protonació-desprotonació, amb els valors aparents de  $pK_a$  que s'indiquen a continuació (Theorell, 1941).



D'acord amb això, la forma nativa de la proteïna, amb coordinació Met - His, correspondria a la espècie III. Segons es va disminuint el pH, la proteïna primer ( $pK_a = 2,50$ ) dóna lloc a una espècie intermitja (II), de tipus *molten globule* (Dyson, 1982; Goto, 1990a, 1990b), que a pH fortament àcid ( $pK_a = 0,42$ ) evoluciona cap a l'estat completament desplegat (I), en el que l'àtom metàl·lic ha perdut els seus dos lligands axials.



**Figura 58.** Representació del grup hemo c i els seus lligands axials presents a YCit c.

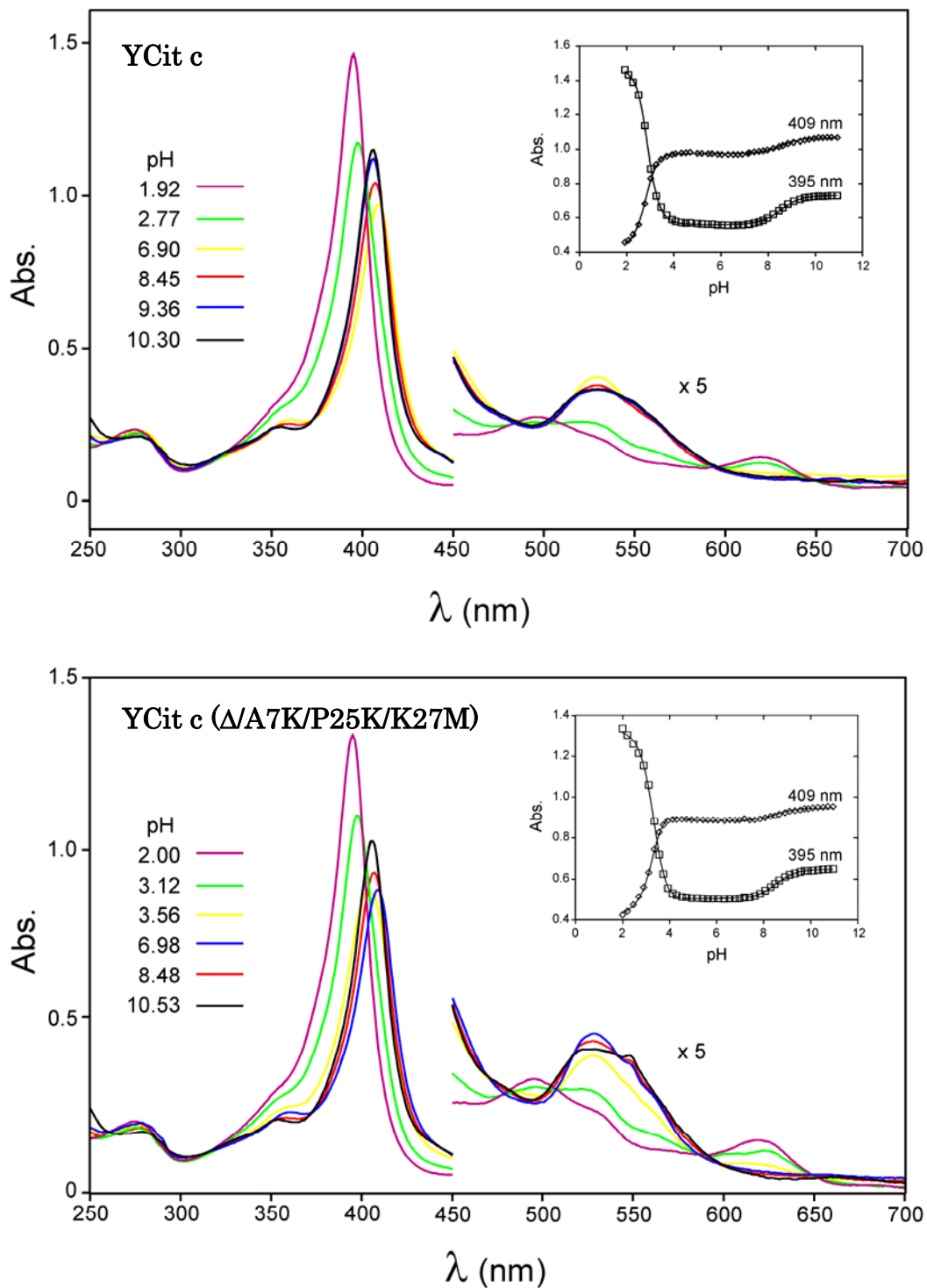
D'altra banda, en anar des de pH 7 cap a pH bàsic, es produeix una transició que dóna lloc a una o més espècies alcalines (IV), resultat del desplaçament del lligand Met per un altre lligand de la pròpia proteïna, probablement el grup  $\epsilon$ -amino d'una Lys, mentre que a pH fortament bàsic l'estat V representa una heterogeneïtat conformacional deguda a la desnaturalització de la proteïna (Brayer, 1996). La transició alcalina ha estat àmpliament estudiada pel YCit c i s'han identificat les Lys 73 i Lys 79 com els residus que desplacen la Met 80 (Dopner, 1998). En aquest sentit, la substitució dels residus 7 i 25 per dues Lys en els mutants considerats en aquest treball, podia fer pensar en l'aparició de noves formes alcalines degudes a la intervenció d'aquests residus com a lligands axials del grup hemo. Aquest fet previsiblement es reflexaria en una variació dels  $pK_a$  determinats per a la transició alcalina de cadascun d'aquests mutants. Tot i que

aquest residus de Lys introduïts en les posicions 7 i 25 no intervinguessin directament com a lligands axials del grup hemo desplaçant la Met 80, sí podrien fer variar indirectament el valor del pK<sub>a</sub> aparent de la transició alcalina degut a que introduirien canvis en l'entorn electrostàtic del grup hemo, que podrien afectar la tendència a la protonació /desprotonació dels residus de Lys 72, 73 i 79.

D'acord amb l'anterior, es van enregistrar els espectres d'absorció electrònica dels mutants YCit c (Δ), YCit c (Δ/A7K/K27M), YCit c (Δ/P25K/K27M) i YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M), així com el de YCit c, entre pH 2-12. La Figura 59 il·lustra els resultats obtinguts pels citocroms YCit c i YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M). Les característiques dels espectres d'absorció electrònica indicaven una dependència de l'estructura de l'entorn del grup hemo amb el pH que es correspondria amb la formació de diferents espècies. La representació de l'absorció en funció del pH permet seguir més clarament la interconversió d'aquestes espècies. L'ajust d'aquestes corbes a una expressió derivada de l'equació de Henderson – Hasselbach per a múltiples ionitzacions (Materials i Mètodes, apartat 5.3), va permetre determinar el valor dels pK<sub>a</sub> que caracteritzen les transformacions de l'entorn de l'àtom metàl·lic (Taula 18).

**Taula18.** Valors de pK<sub>a</sub> determinats a partir de l'ajust a un model matemàtic de tres ionitzacions (veure apartat Materials i mètodes) de les corbes d'absorció a diferents λ en funció del pH obtingudes per al YCit c i els mutants YCit c (Δ), YCit c (Δ/A7K/K27M), YCit c (Δ/P25K/K27M) i YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M). Entre parèntesi es donen les desviacions estàndard dels valors determinats.

Citocrom c	pK <sub>a</sub> <sup>1</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>2</sup>	pK <sub>a</sub> <sup>3</sup>
YCit c	2,86 (0,14)	8,42 (0,12)	10,30 (0,12)
YCit c (Δ)	3,12 (0,09)	8,39 (0,08)	10,58 (0,08)
YCit c (Δ/A7K/K27M)	3,41 (0,13)	8,25 (0,12)	10,68 (0,12)
YCit c (Δ/P25K/K27M)	3,24 (0,14)	8,32 (0,13)	10,62 (0,13)
YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M)	3,34 (0,13)	8,36 (0,12)	10,48 (0,12)



**Figura 59.** Espectres d'absorció electrònica obtinguts per YCit c i YCit c (Δ/A7K/P25K/K27M) a diferents valors de pH (C = 10 μM; fosfat sòdic 100 mM; 25 °C). Així mateix es mostra la dependència en cada cas d'Abs. a 395 i 409 nm en funció del pH; la línia contínua correspon al resultat de l'ajust de les dades experimentals a l'equació de Henderson – Hasselbach per a tres ionitzacions.

D'aquests experiments es va deduir que en les condicions estudiades, el YCit c i els mutants derivats es comportaven de forma molt similar, donant lloc almenys a quatre espècies que s'interconverteixen segons el pH. El  $pK_a$  de la transició alcalina és en tots els casos  $\sim 8,3$ , no havent-se observat, ni tant sols pel cas de la proteïna salvatge un valor més proper al reportat per Rosell i col·laboradors per a YCit c (7,95) (Rosell, 1998), el qual s'havia assignat a la coordinació del residu de Lys72. Aquesta diferència es podria atribuir a que les condicions en que es van dur a terme aquests experiments diferien de les reportades en la bibliografia, on van determinar el  $pK_a$  ajustant la corba d'Abs a 695 nm respecte el pH. Les nostres concentracions de proteïna de treball no van permetre avaluar la variació de l'absorbància a 695 nm donada la baixa absorció a aquesta longitud d'ona. D'altra banda, els valors per a la transició alcalina dels diferents mutants, tan similars al de la proteïna salvatge, posaven de manifest que ni la Lys 7 ni la Lys 25 participaven directament com a lligands axials del grup hemo. L'efecte d'aquestes mutacions quedaria per tant reduït a un augment de la densitat de càrrega positiva en les proximitats del grup hemo. Aquest augment podria afavorir la desprotonació de les cadenes laterals dels residus de lisina que poden desplaçar la Met 80, disminuint el seu  $pK_a$ , i aquest efecte podria explicar les petites diferències observades entre la proteïna salvatge i els mutants. A  $pH > 10,3$ , al medi estarien presents les espècies corresponents a la desnaturalització del citocrom (V).

Per la banda de pH àcid, s'observà així mateix en tots els casos, una transició que tenia lloc amb un  $pK_a$  aparent entre 2,86, pel citocrom salvatge, i 3,41 pel YCit c ( $\Delta A7K/K27M$ ). Aquesta transició es podia interpretar com la descrita per Goto i col·laboradors (Goto, 1990a, 1990b) cap a la formació de l'estat de *molten globule* (II). Les característiques dels espectres d'absorció electrònica de les cinc proteïnes mostraven un desplaçament ipsocròmic de la banda de Soret des de 409 nm, a pH 7,0, fins a  $\sim 395$  nm a pH  $\sim 2$ , juntament amb la desaparició del màxim d'absorció a  $\sim 530$  nm i la conseqüent aparició de sengles bandes de transferència de càrrega a  $\sim 500$  i  $\sim 620$  nm, generant espectres semblants al de la *met*-mioglobina ( $\lambda_{max} = 408, 502$  i  $630$  nm) (Hildebrand, 1995), que posaven de manifest la formació d'espècies de spin alt.

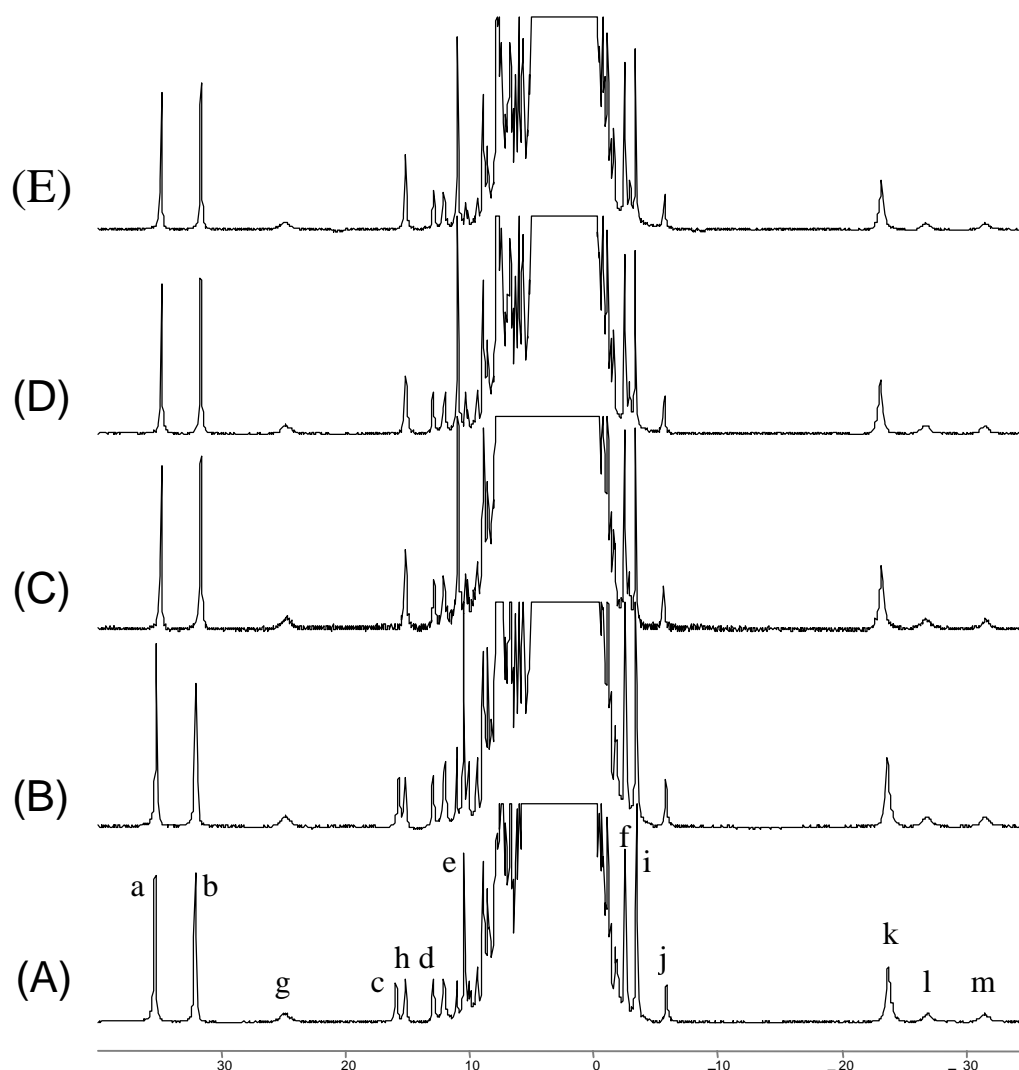
Aquests resultats en qualsevol cas suggerien que no hi havien diferències substancials entre la dependència de les propietats electròniques i de coordinació del grup prostètic dels mutants i el de la proteïna salvatge en funció del pH.

### 3. Anàlisi per ressonància magnètica nuclear.

En els darrers anys la ressonància magnètica nuclear s'ha emprat cada cop més àmpliament en l'estudi i caracterització d'hemoproteïnes (Baistrocchi, 1996; Turner, 1998). Les connectivitats entre els residus per a l'assignació seqüencial i la determinació dels elements d'estructura secundària de la proteïna requereixen de la informació obtinguda d'espectres en dues dimensions, tipus COSY i NOESY, que per al YCit c van ser reportats per primer cop per Gao i col·laboradors (Gao, 1990). Els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de citocrom c així com els d'altres hemoproteïnes, es caracteritzen per la gran dispersió dels senyals deguda a la presència del grup hemo. Hi ha dos fets que contribueixen a augmentar aquesta dispersió: d'una part el corrent d'anell generat pels grups aromàtics de la porfirina, i d'altra la presència de l'àtom de ferro que, en estat oxidat ( $\text{Fe}^{3+}$ ), presenta una distribució electrònica  $d^5$  de spin baix, essent paramagnètic amb un electró desaparellat.

L'anàlisi dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de les diferents proteïnes recombinants preparades durant el present treball podia proporcionar informació addicional per determinar si la introducció de les mutacions havia produït variacions en l'estructura de l'entorn del grup hemo. A la Figura 60 i la Taula 19 es recullen els resultats dels experiments de  $^1\text{H}$ -RMN realitzats amb el YCit c i els mutants estudiats a pH 7,0 i 23 °C. L'assignació dels senyals es va realitzar en base a dades de la literatura per al YCit c (Moench, 1989; Gao, 1990). A la Taula 19 s'inclouen les diferències en la posició dels senyals de cadascun dels mutants estudiats respecte a les de YCit c ( $\Delta\delta$ ). En el cas del mutant de deleció, YCit c ( $\Delta_{5\rightarrow 1}$ ), els valors de  $\Delta\delta$  no van superar en cap cas les 0,2 ppm, el que suggereix que la deleció no tenia efectes importants sobre l'entorn electrònic del grup hemo ni sobre l'estructura de la proteïna. D'altra banda, els tres mutants restants estudiats sí que van presentar diferències apreciables en les posicions d'alguns senyals respecte dels observats per YCit c. En particular, els senyals dels metils porfirínics en posicions 3, 5 i 8 es trobaven desplaçats entre 0,48 i 0,54 ppm respecte dels de YCit c, mentre que un dels senyals atribuïbles al metilè en posició  $7\alpha$  mostraven desplaçaments de quasi 0,8 ppm. Finalment, el senyal que s'atribueix al grup  $\epsilon$ -metil de la Met 80 estava desplaçat entre 0,56 i 0,67 ppm respecte a YCit c. Aquestes variacions, si bé eren significatives, probablement no eren degudes a un canvi conformacional important en l'estructura de la proteïna, sinó a un canvi en l'ambient electrònic del grup hemo. Un examen de l'estructura cristal·lina reportada pel YCit c (Louie, 1990), revelava que l'àtom de N del grup  $\epsilon$ -amino de la Lys 27 es trobava només a uns 9 Å del substituents 3- $\text{CH}_3$  i  $4\alpha$ -CH porfirínics, respectivament, el que feia pensar que la substitució d'aquest

residu per un de Met podria donar lloc a un cert reordenament de la distribució de càrregues sobre el sistema porfirínic que podria ser responsable, almenys en part, de les variacions observades. Petits canvis conformacionals deguts a les interaccions amb les cadenes laterals dels nous residus introduïts per mutagènesi, podrien alterar els contactes dels substituents del sistema porfirínic i contribuir també als desplaçaments observats. La possibilitat que el canvi observat en la posició del senyal assignat al grup  $\epsilon$ -metil de Met 80 pogués ser degut en realitat a la coordinació de la Met 27 es va descartar, donat que aquest residu es troba al costat oposat del grup hemo. Aquesta substitució, per tant, requeriria un canvi conformacional molt important que previsiblement donaria lloc a alteracions més grans en els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN.



**Figura 60.** Espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de (A) YCit c, (B) YCit c ( $\Delta$ ), (C) YCit c ( $\Delta$ /A7K/K27M), (D) YCit c ( $\Delta$ /P25K/K27M) i (E) YCit c ( $\Delta$ /A7K/P25K/K27M).

**Taula 19.** Desplaçaments químics,  $\delta$  (ppm), i assignació dels senyals observats als espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de la Figura 60. Les assignacions es van realitzar per comparació amb les dades reportades a la literatura (Moench, 1989; Gao, 1990). La nomenclatura emprada per als substituents porfirínics així com per als lligands axials s'indica a la Figura 58.  $\Delta\delta$  es defineix com la diferència entre els desplaçaments químics dels senyals de cada mutant i els de la proteïna salvatge (Ycit c). En negreta es destaquen les diferències més significatives en els desplaçaments químics.

Assignació	YCit c	YCit c( $\Delta_{5\rightarrow 1}$ )	YCit c( $\Delta_{5\rightarrow 1}$ /A7K/K27M)	YCit c( $\Delta_{5\rightarrow 1}$ /P25K/K27M)	YCit c( $\Delta_{5\rightarrow 1}$ /A7K/P25K/K27M)
Hemo	$\delta$	$\delta$	$\Delta\delta$	$\delta$	$\Delta\delta$
a 8 - CH <sub>3</sub>	35.51	35.40	-0.11	35.00	<b>-0.51</b>
b 3 - CH <sub>3</sub>	32.26	32.19	-0.07	31.78	<b>-0.48</b>
c 7 $\alpha'$ - CH	16.01	15.81	-0.20	15.22	<b>-0.79</b>
d 7 $\alpha$ - CH	13.00	13.02	0.02	12.95	-0.05
e 5 - CH <sub>3</sub>	10.52	10.60	0.08	10.99	<b>0.47</b>
f 2 $\beta$ - CH <sub>3</sub>	-2.47	-2.48	-0.01	-2.43	0.04
Aminoàcids					
g His18 $\delta$ - C H	24.97	24.94	-0.03	24.87	-0.10
h His18 $\beta$ -CH	15.24	15.27	0.03	15.22	-0.02
i Leu68 $\delta$ - CH <sub>3</sub>	-3.38	-3.37	0.01	-3.31	0.07
j Pro30 $\delta$ - CH	-5.81	-5.75	0.06	-5.54	0.27
k Met80 $\varepsilon$ - CH <sub>3</sub>	-23.69	-23.59	0.10	-23.13	<b>0.56</b>
l His18 $\varepsilon$ -CH	-26.87	-26.79	0.08	-26.74	0.13
m Met80 $\gamma$ - CH <sub>3</sub>	-31.50	-31.44	0.06	-31.68	-0.18