

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN DE MODULADORES DEL  
APOPTOSOMA MEDIANTE QUÍMICA COMBINATORIA

GEMA MALET ENGRA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de Març de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Ángel García Martín
- D. Ángel Messeguer i Peipoch
- D<sup>a</sup>. Concepción Abad Nazario
- D. Oriol Bachs Valldeneu
- D. Alberto Anel Bernal

Va ser dirigida per:

D. Enrique Pérez Paya

©Copyright: Servei de Publicacions  
Gema Malet Engra

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6359-0

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**IDENTIFICACIÓN DE MODULADORES DEL  
APOPTOSOMA  
MEDIANTE QUÍMICA COMBINATORIA**

Memoria presentada por  
**Gema Malet Engra**  
Para optar al grado de  
**Doctora en Ciencias Biológicas**

**Director**  
**Dr. Enrique Pérez Payá**

VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA







ENRIQUE PÉREZ PAYÁ, Doctor en Ciéncias Químicas e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)

CERTIFICA, que el trabajo titulado “Identificación de moduladores del apoptosoma mediante química combinatoria” ha sido realizado bajo su dirección por GEMA MALET ENGRA en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, como tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firma el presente certificado en Valencia a 14 de Diciembre de 2004

Fdo. Enrique Pérez Payá

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

*A mis seres queridos*



# Agradecimientos

Gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por enseñarme bioquímica, por crear ese ambiente humano tan agradable y tan propicio para el trabajo donde basta con salir al pasillo para preguntar. Han sido muchas horas entre esas paredes.

A Quique por darme la oportunidad de realizar la tesis en su grupo y confiar en mí para desarrollar un proyecto del que, en un principio, no sabíamos nada.

A todos mis compañeros del laboratorio de Péptids por compartir tantas horas durante este tiempo; Marçal me hizo reír todos los días que compartí laboratorio con él (termostato!), él y Helena me enseñaron los primeros trucos con el DNA. Gracias a Maite por mancha y por su complicidad, a Hermi por su compañerismo y por su hospitalidad en D.C., a Sauri por tus enseñanzas musicales, lingüísticas, por su conversación de banco a banco y a ella y a Tere por su compañía a altas horas en el laboratorio, a Puig por mantenerme bien entretenida cuando se fue Marçal, a Desi por su dedicación y su simpatía, a Santi por compartir más de una carcajada, a Ana (Heavy) por su buen rollo, también gracias a Ali, y Cris por poner orden y Mar por ponerme al mando del fluorímetro y por aceptar mi relevo. Me gustaría agradecer a Jesús, Cucha e Ismael el permitirme conservar mi “nicho” en Péptids esos últimos meses de tesis

Dunja, ! gracias por aparecer en mitad de mi tesis ! Agradezco enormemente la convivencia tan grata que hemos tenido durante el tiempo que compartimos laboratorio, su amistad y su apoyo incondicional en el día a día con la tesis. Realmente disfruté el tiempo en que trabajamos juntas.

A Nuria Canela le debo mis primeros pasos en la construcción de baculovirus recombinantes. Gracias a Nuria, Rosa Aligue y Oriol Bachs por hacerme sentir tan cómoda durante mi estancia en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Barcelona, por compartir alguna que otra pernilada y a Carmen por enviarme células cuando me quedé “sin”.

Quiero agradecer a María Luisa Salas Falgueras el permitirme realizar una estancia en su laboratorio del C.B.M. (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa). Allí me encomendaron a Javier Rodríguez con quien tuve una interacción científica realmente positiva, de quien aprendí mucho a cerca del mundillo baculoviral, el cultivo líquido y las células high five, y a quien llamé mas de una vez con posterioridad para contarle las virguerías que hacían los virus.



Muchas gracias a la gente de su laboratorio en especial a Ali Alejo, Verónica y Carolina por compañía durante mi estancia y por sus envíos de células s.o.s.

Howard O. Fearnhead me brindó la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio del N.C.I.-Frederick como Guest Researcher. Quiero darle las gracias por su empatía, por transmitirme su motivación y pensar experimentos conmigo y discutirlos. Gracias a Leobaldo y Nancy por el día a día en el lab.

La ayuda de Angel G. Martín ha sido absolutamente vital para mi tesis. Quiero agradecer su constante apoyo en momentos difíciles, no solo durante la estancia en Frederick sino antes y después de la misma, por transmitirme su entusiasmo científico por la apoptosis, por su constante y valiosa comunicación científica, por su ayuda con tantas cosas relativas a mi estancia, por el visado, por las cinco horas de espera en el aeropuerto, por impedir que mi cartera sedimentase en la papelera de un restaurante de comida basura, por las paellas, las barbacoas, por hacer de chofer donde no hay transporte público, por hacerme creer que la ciencia vale la pena y por ser testigo de que Apaf sucks! Gracias a Clara, a Blanca y a Angel por su hospitalidad durante mi estancia en Frederick y por su amistad.

No puedo olvidarme de Ana Flores a quien agradezco su organización en el servicio cultivos, y sobretodo el estar a mi lado en las cruzadas anti-hongos y por insistir hasta descubrir una de las claves de mi tesis: que el techo del pasillo estaba conectado a la red permanente.

He disfrutado inmensamente de la convivencia diaria en el Departamento con Pepa, Ana Ruiz, Bárbara, Julia, Lorena. ¡ Gracias por vuestra amistad ! Gracias a Paco por su paciencia y sus consejos informáticos (no me cuente usted su vida), a Nelo por su transmitirnos su inquietud política, social y folclórica y por Lian Shan Po, a Vicent Sancenon por ser como es. A todos mis compañeros de comidas por compartir tan buenos momentos y por los incisos en la sala de becarios, a todos los compañeros de Bioquímica; Maria Jesús, Ana Poveda, en especial a Toni Gabaldon y Puri por las comidas semanales en el poli y por su amistad, y a todos los que te encuentras por el pasillo y te sonríen y se interesan por cómo te va.

A Ramón Sendra por enseñarme una última técnica bioquímica y al laboratorio de acetilación por abrirme sus puertas durante mi último intento de responder alguna preguntilla más sobre Apaf antes de terminar la tesis.

También quiero dar las gracias a Jordi Bujons, Angel Messeguer y Noemí Marina por su colaboración y por el tiempo que me han prestado en nuestras reuniones y conversaciones

telefónicas y por mail. Gracias a Isabel Masip por la gran cantidad de pseudopéptidos sintetizados y su estrecha colaboración, a María Jesús Vicente por la síntesis de los pseudopéptidos de fusión y a Ana Giménez por la síntesis de los péptidos de citocromo. Gracias a Isabel Marzo por su colaboración en los experimentos con células. A Ana Sempere y Antonio Ferrer por los experimentos en 293 y por las consultas telefónicas. A Juan Carlos le debo el diseño de la cubierta de la tesis y el haberme colado el apoptosoma entre diseño y diseño en el trabajo.

Gracias a mi madre, a mi hermano y a mi yaya por su cariño.



# Indice

---

## Abreviaturas

<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Apoptosis	1
1.2. Caspasas: enzimas ejecutoras de la apoptosis	2
1.3. Principales rutas apoptóticas	4
1.4. Familia de proteínas de Bcl-2	4
1.5. El apoptosoma	6
1.6. Mecanismos adicionales de regulación del apoptosoma	10
1.7. Apoptosis y enfermedad: vía mitocondrial y apoptosoma	13
1.8. Objetivos	19
<b>2. Reconstitución <i>in vitro</i> del apoptosoma.</b>	21
2.1. Introducción a la baculovirología	22
2.2. Generación de baculovirus recombinantes y expresión de Apaf-1 mediante transposición sitio-específica. Método Bac-to-Bac	25
2.2.1. Construcción de baculovirus recombinantes de Apaf-1	25
2.2.2. Generación y cuantificación de stocks virales	30
2.2.3. Caracterización de la cinética de expresión de Apaf-1 y optimización de la expresión en cultivo líquido de células de insecto.	32
2.2.4. Purificación de Apaf-1	36
2.3. Reconstitución de apoptosomas <i>in vitro</i>	37
2.4. Purificación de Apaf-1 por FPLC y caracterización de su actividad en extractos celulares de mamífero.	40
<b>3. Identificación de Moduladores del Apoptosoma</b>	45
3.1. Química combinatoria	
3.2. Quimioteca de pseudopéptidos	45
3.3. Cribado de la quimioteca pseudopéptidos.	47
3.4. Dosis dependencia de las mezclas	50
3.5. Pseudopéptidos definidos	51
3.6. Estudio de la agregación de los pseudopéptidos mediante espectroscopia de fluorescencia	55
3.7. Síntesis de análogos del pseudopéptido 15-20-15	56
3.8. Determinación de la IC <sub>50</sub>	57
3.9. Pseudopéptidos análogos para utilización estudios <i>in vivo</i> TJ1a, TAT, PEN y Cyc	58
3.10. Efecto del tiempo preincubación sobre la inhibición	60

3.11. Otros cribados	61
3.12. Diseño racional de moduladores: péptidos derivados de citocromo c.	62
<b>4. Caracterización molecular del mecanismo de inhibición de los pseudopéptidos</b>	<b>67</b>
4.1. Análisis del procesamiento de procaspasa 3 en ensayos <i>in vitro</i>	67
4.2. Estudio de la activación de caspasas en extractos celulares	69
4.3. Efecto del pseudopéptido 1a sobre la oligomerización de Apaf-1	71
4.4. Análisis de la influencia del ATP sobre la inhibición mediada por el pseudopéptido 1a	74
4.5. Interacción de procaspasa 9 con el apoptosoma	76
4.6. Estudio de la interacción Apaf-1-pseudopéptido 1a	77
4.7. Efecto del pseudopéptido 1a sobre otros componentes del sistema	79
4.8. Análisis funcional del apoptosoma	81
4.9. Inhibición de la actividad de Apaf-1 celular por los pseudopéptidos	84
4.10. Ensayos <i>in vivo</i>	85
4.10.1. Ensayos de citotoxicidad de los pseudopéptidos 1a y 1d	85
4.10.2. Inducción de apoptosis y ensayo de los peptoides TJa, Cyc PEN, y TAT en células U937	86
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>91</b>
5.1. Manipulación de <i>Escherichia coli</i>	91
5.1.1. Cepas de <i>E. coli</i>	91
5.1.2. Condiciones de crecimiento	91
5.1.3. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	92
5.2. Manipulación de células de insecto	92
5.2.1. Líneas celulares	92
5.2.2. Medios y suplementos	92
5.2.3. Condiciones de crecimiento y de infección	93
5.3. Manipulación de células de mamífero	93
5.3.1. Líneas celulares	93
5.3.2. Medios y suplementos	94
5.4. Manipulación de baculovirus	94
5.4.1. Construcción de baculovirus recombinantes	94
5.4.2. Obtención, amplificación y titulación de stocks virales	95
5.4.3. Titulación de stocks virales	95
5.5. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos	96
5.5.1. Purificación de plásmidos de <i>E. coli</i>	96

5.5.2. Subclonado del DNA que codifica para la proteína Apaf-1-1-XL	96
5.5.2.1. Diseño de la construcción	96
5.5.2.2. Reacciones de PCR	97
5.5.2.3. Secuenciación del DNA	98
5.5.3. Otras reacciones enzimáticas	98
5.5.4. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos	99
5.5.5. Purificación de DNA viral, PCR y secuenciación	99
5.6. Aislamiento y manipulación de proteínas	100
5.6.1. Obtención y análisis de proteínas recombinantes	100
5.6.1.1. Expresión de Apaf-1 en células de insecto	100
5.6.1.2. Purificación de Apaf-1	100
5.6.1.3. Expresión <i>in vitro</i> de procaspasas 9 y 3	101
5.6.2. Electroforesis y análisis <i>Western blot</i>	102
5.6.3. Ensayos de <i>pull-down</i>	103
5.7. Ensayos de Apoptosis <i>in vitro</i>	103
5.7.1. Ensayo de reconstitución de apoptosomas <i>in vitro</i>	104
5.7.2. Ensayos de detección del procesamiento de caspasas <i>in vitro</i> utilizando extractos libres de células.	104
5.7.2.1. Preparación y fraccionamiento de extractos celulares	105
5.7.2.2. Ensayo fluorométrico	107
5.8. Ensayos <i>in vivo</i>	107
5.8.1. Estudios de citotoxicidad	107
5.8.2. Inducción de apoptosis y análisis mediante citometría de flujo	108
5.9. Ensayos de polarización de la fluorescencia	109
5.10. Estudio con la sonda fluorescente DPH	110
5.11. Cribado de quimiotecas combinatorias	110
<b>Discusión</b>	113
<b>Conclusiones</b>	121
<b>Bibliografía</b>	123

## Abreviaturas

---

Anexina V-FITC	Anexina conjugada con isotiocianato de fluoresceína
ANT	<i>Adenine Nucleotide Translocator</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing Factor</i>
Apaf-1	<i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	5-bromo-1-cloro-3-indolil-fosfato
Bcl-2	<i>B cell leukemia/lymphoma-2</i>
BH	Dominios Bcl-2 de homología
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
BrEt	Bromuro de etidio
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
Caspasa	<i>Cysteine-Aspartate-Protease</i>
Cels/ml	Células por mililitro
Cit C	Citocromo c
C-terminal	Carboxilo terminal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido [etilenebis(oxonitrilo)]tetraacético
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
Fas-L	Ligando de Fas
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
FT	Extracto citoplasmático de mamífero deficiente en caspasas y
F1	Extracto citoplasmático de mamífero deficiente en Apaf-1, caspasas y Cit c
IAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
IC <sub>50</sub>	Concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopiranosido
MDI	Multiplicidad de infección
NBT	Azul de nitrotetrazolio
N-terminal	Amino terminal
PAK-2	<i>p21-activated kinase 2</i>
PARP	Poli(ADP-ribosil) polimerasa

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PC9	Procaspasa 9
PC9 NH	Procaspasa 9 No Hidrolizable
PC3	Procaspasa 3
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PKC	Proteína quinasa C
mPTP	<i>Mitochondrial permeability-transition pore</i>
PS	Fosfatidilserina
SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UFA/min	Unidades de fluorescencia arbitrarias por minuto
Ufp/mL	Unidades formadoras de placas por mililitro
UV	Ultravioleta
VDAC	<i>Voltage-dependent Anion Channel</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
Z-VAD.fmk	Benciloxicarbonil-valina-alanina-aspartato-fluorometilcetona
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
$\Delta\varepsilon$	Coefficiente de extinción de fluorescencia







# 1. Introducción

---

## 1.1. Apoptosis

El cuerpo humano adulto elimina alrededor de  $10^{11}$  células diariamente, fundamentalmente a través del proceso denominado muerte celular programada o apoptosis. Es un proceso celular fundamental esencial para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una cascada dependiente de energía, de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas en células cancerosas. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye la condensación de la cromatina, condensación citoplasmática y nuclear, la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos, la rotura específica de proteínas celulares y la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos que finalmente serán fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. La apoptosis se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis. La apoptosis es un proceso claramente diferenciado del proceso de muerte celular por necrosis, la cual tiene carácter patológico e implica un daño patológico celular extremo. La necrosis es un proceso pasivo, que no requiere de la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido; se caracteriza principalmente por la ruptura osmótica de la célula debida a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática y por la respuesta inflamatoria que se desencadena a consecuencia de esta citolisis.

La mayor parte del conocimiento que hoy tenemos de la genética molecular de la apoptosis proviene de investigaciones sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis y Horvitz, 1986). La descripción de los genes implicados en la maquinaria de apoptosis en *C. elegans* estableció las bases para la caracterización, hoy aún incompleta, de la compleja red de procesos que culminan con la apoptosis celular. Dado que las moléculas relacionadas con el proceso de apoptosis se han conservado a lo largo de la evolución desde organismos como *C. elegans* hasta mamíferos, el conocimiento de la apoptosis en el nematodo se trasladó a mamíferos identificándose genes

## Introducción

homólogos que ejercían las funciones de regulación y ejecución de la apoptosis. Este hecho, junto con la evolución de las técnicas bioinformáticas, de biología molecular, y la secuenciación del genoma humano han dado un gran impulso al conocimiento actual de la muerte celular programada.

### **1.2. Caspasas: enzimas ejecutoras de la apoptosis**

El componente ejecutor de la maquinaria apoptótica es una familia de proteasas llamadas caspasas (*cysteine-aspartate-protease*) (Earnshaw *et al.*, 1999, Hengartner 2000, Nicholson 1999, Thornberry y Lazebnik 1998). Son una familia de proteasas que se caracterizan por su especificidad por sustratos que contienen ácido aspártico y por el uso de la cadena lateral de la cisteína de su centro activo en la catálisis. En la actualidad se conocen 14 caspasas que se pueden subdividir en dos familias que participan en la inflamación en respuesta a citoquinas o bien en apoptosis. Las caspasas se encuentran presentes en todas las células nucleadas en forma de proenzimas o zimógenos inactivos. Se activan mediante corte proteolítico integradas en un mecanismo de señalización en cascada en el que una caspasa procesa y activa a otra caspasa posterior en la ruta, la cual a su vez es capaz de activar a la siguiente creando una cascada expansiva de actividad proteolítica (Slee *et al.*, 1999). Las procaspasas (30-50 kDa) contienen tres dominios: un prodominio N- terminal, una subunidad grande y una subunidad pequeña. Las caspasas activas se componen de dos heterodímeros que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las dos subunidades grandes (Figura 1). Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis. Dentro del grupo de las caspasas implicadas en apoptosis existen caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. El grupo iniciador comprende a las caspasas 2, 8, 9, y 10. El grupo ejecutor incluye a las caspasas 3, y 6, 7. La activación inicial de las caspasas es un proceso irreversible, complejo, y altamente regulado para garantizar que sólo ocurra cuando realmente sea necesario. Una de las características bioquímicas de las caspasas es su alta especificidad por los sustratos que hidrolizan. Reconocen secuencias de cuatro aminoácidos que contienen un residuo de ácido aspártico, pero sin embargo la estructura terciaria de las proteínas resulta determinante en el

reconocimiento e hidrólisis de los sustratos. De esta manera las caspasas no hidrolizan todas las proteínas que contienen dicha secuencia y se evita una degradación aleatoria de proteínas durante el proceso de apoptosis.

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie restringida de proteínas con objeto de cortar contactos con células vecinas, reorganizar el citoesqueleto, activar las endonucleasas (fragmentación del DNA), dismantelar las láminas nucleares, expresar señales de fagocitosis (exposición de fosfatidilserina en el exterior de la membrana plasmática), y activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas. El enzima poli(ADP-ribosil) polimerasa o PARP, fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP está implicada en la reparación del DNA dañado, y funciona catalizando la síntesis de poli(ADP-ribosa), que se une a las cadenas rotas de DNA y modifica a las proteínas nucleares. Se han descrito también como sustratos de caspasas enzimas que reparan el DNA (DNA-PKcs), que fragmentan el DNA (ICAD-L-(S)), factores de transcripción (retinoblastoma, MDM2), proteínas quinasas y fosfatasas reguladoras del ciclo celular (PKC, fosfatasa 2A, Akt, Raf1), proteínas implicadas en el procesamiento de RNA mensajero (U1-70) y proteínas reguladoras de la apoptosis (Bid). Otros sustratos de caspasas están relacionados con la estructura celular como la laminina de la lámina nuclear, la actina, la gelsoina y la quinasa de adhesión focal o FAK y PAK2 (reorganización del citoesqueleto).

**Figura 1. Modelo de la estructura de caspasa 3.** El tetrámero de caspasa, en azul, se compone de dos subunidades grandes y dos pequeñas, que proceden de dos proenzimas. El heterodímero posee dos centros activos. En la figura se representa la unión de un inhibidor (en rosa) a cada centro activo (tomado de Nicholson *et al.*, 2000)



### 1.3. Principales rutas apoptóticas

En mamíferos existen al menos dos grandes vías bien caracterizadas de activación de la cascada apoptótica de las caspasas (Hengartner, 1998, 2000). Una de ellas, la vía extrínseca se activa por señalización extracelular y requiere de la participación de receptores específicos de membrana. La vía intrínseca responde al estrés celular, agentes tóxicos, radiación, agentes oxidantes, sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , lesión al DNA; se activa en respuesta a oncogenes, e implica la desestabilización de la mitocondria. En ambos casos, existen moléculas que se encargan de formar un complejo capaz de captar y activar a una caspasa iniciadora. Así por ejemplo, miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) como Fas/APO-1, cuando son activados inducen la captación de procaspasa 8 al receptor Fas vía la proteína adaptadora FADD. Así procaspasa 8 es autoprosesada en el complejo, activando ésta a procaspasa 3 y disparando la cascada de activación.

Alternativamente, la mitocondria ha sumado a su papel de orgánulo generador de energía, el papel de centro de convergencia y de integración de señales de supervivencia y de muerte celular. La activación de la vía mitocondrial conlleva tres fenómenos interrelacionados que incluyen: (1) la disrupción del transporte electrónico, fosforilación oxidativa, y producción de ATP, (2) la alteración del potencial de oxido-reducción de la membrana mitocondrial, y (3) la liberación de proteínas mitocondriales al citoplasma que disparan la activación de las caspasas (Green *et al.*, 1998).

### 1.4. Familia Bcl-2.

La familia de proteínas de Bcl-2 regula la permeabilización de la membrana mitocondrial por las acciones opuestas de sus miembros proapoptóticos y antiapoptóticos en un proceso intrincado y no del todo conocido (Cory y Adams 2002). Las proteínas Bcl-2 pueden contener de uno a cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH, *Bcl-2 homology*). Parece que el dominio BH3 es esencial y suficiente para la actividad proapoptótica y supresora tumoral y que el resto de los dominios BH están relacionados con una función anti-apoptótica. Las interacciones opuestas entre miembros de la familia Bcl-2 establecen un equilibrio entre los estímulos de

señalización proapoptóticos y antiapoptóticos. La capacidad de formación de homo y heterodímeros entre miembros de la familia Bcl-2 pueden dar lugar a su activación o inactivación.

La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH que las integran: (1) Antiapoptóticas y oncogénicas, las que comparten homología de secuencia en los dominios BH1, BH2, BH3, y BH4: Bcl-2 y Bcl-XL (2) Proapoptóticas, las que comparten la homología de los dominios BH1, BH2 y BH3: Bax y Bak. (3) Proapoptóticas, las que comparten la secuencia de homología solo en el dominio BH3: Bid, Bik y Bim.

La heterodimerización es muy importante para los miembros pro-apoptóticos del grupo BH3 que basan gran parte de su funcionamiento en la unión a las proteínas anti-apoptóticas alterando su actividad. Las proteínas multidominios proapoptóticas, como Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee solo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas, solo BH3, como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, origina la inactivación de Bax y Bak. La integridad de la membrana mitocondrial se altera cuando proteínas solo BH3 como Bim, Bik y Bad se unen a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y neutralizan su acción. Entonces miembros proapoptóticos como Bax y Bak, forman homooligómeros en la membrana mitocondrial (Gross *et al.*, 1999). Se ha demostrado que Bax se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (mPTP), que está formado por el transportador de adenín nucleótido (ANT), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (VDAC) y la ciclofilina D (Crompton *et al.*, 1999). El poro mPTP participa en la regulación del  $Ca^{2+}$ , el pH, el potencial de la membrana, y el volumen mitocondrial y funciona como un canal aniónico. La proteína proapoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT que se localiza en la membrana interna mitocondrial (Marzo *et al.*, 1998, Shimizu *et al.*, 1999). La apertura del poro trae consigo un descenso en el potencial de membrana y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluyen Cit c, Smac/DIABLO, Omi/Htra 2 y el factor inductor de la apoptosis (AIF). AIF es una proteína que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas (Susin *et al.*, 1999). La función de la proteína Smac/Diablo es bloquear la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP, *inhibitor of apoptosis protein*). No se sabe si la salida de Cit c y otras proteínas ocurre a través del mismo poro mPTP

## Introducción

o indirectamente el poro media la salida.

En algunos tipos celulares las vías extrínseca e intrínseca pueden interconectarse ya que caspasa 8 es capaz de activar la vía intrínseca a través del corte proteolítico y activación de Bid. Bid procesado es capaz de sufrir una traslocación a la mitocondria y provocar la salida de determinadas proteínas al exterior mitocondrial que amplifican la señal apoptótica.

Existen múltiples mecanismos de regulación de la familia Bcl-2 que conectan el metabolismo celular con la apoptosis. Uno de ellos es la fosforilación de la proteína proapoptótica Bad por la serin treonín quinasa Akt, que inhibe su función. Bad fosforilada neutraliza los efectos proapoptóticos de Bax y se disocian los heterodímeros formados por Bad/Bcl-2 o Bad/Bcl-xL. La función de Akt está regulada por la señalización de la PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa), que participa en la ruta de señalización de supervivencia del receptor del factor de crecimiento de insulina I (IGF-IR). Otro ejemplo es la conexión entre el metabolismo de la glucosa y la apoptosis. La privación de glucosa provoca la defosforilación de Bad, la cual, además puede formar un complejo con la enzima glucoquinasa.

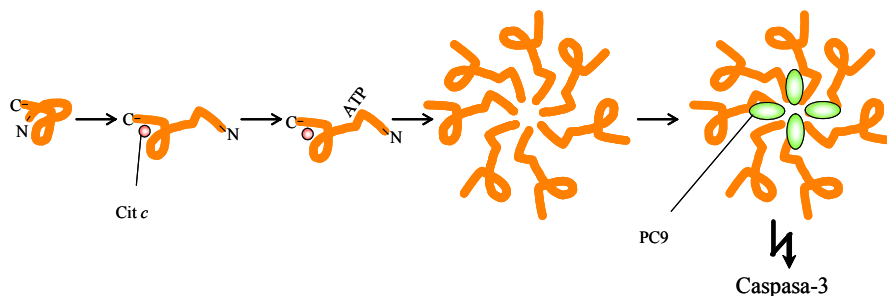
### 1.5. Apoptosoma

Aunque el mecanismo de liberación de Cit c aún es controvertido y no está del todo esclarecido, se trata de un proceso temprano en la apoptosis, rápido, completo y precede a la pérdida de integridad de la membrana celular y exposición de fosfatidilserina características de la apoptosis (Goldstein, *et. al.*, 2000, Jiang y Wang 2004). Cit c citoplasmático ejerce un papel como cofactor uniéndose a la proteína Apaf-1 (*Apoptotic Protease-activating Factor-1*), provocando su oligomerización y formando un complejo llamado apoptosoma. Apaf-1 es una proteína citoplasmática de ~130 kDa homóloga de la proteína CED 4 que participa en la muerte celular de *C.elegans*. Fue descubierta por investigadores del grupo de Xiaodong Wang como cofactor que participa en la apoptosis inducida por Cit c, mediante una aproximación bioquímica utilizando extractos de células Hela (Liu *et al.*, 1996). La importancia fisiológica del apoptosoma en apoptosis quedó demostrada en experimentos en los que ratones nulos para el gen Apaf-1 (Apaf *-/-*) tienen una letalidad embrionica marcada con impresionantes lesiones craneofaciales y defectos cerebrales (Cecconi *et al.*, 1998, Yoshida *et. al.*, 1998). Ambos, Apaf-



1 y PC9, son esenciales para la apoptosis mediada por p53 y se presentan como genes supresores de tumores (Soengas *et al.*, 1999, Macleod, 2000).

Apaf-1 tiene tres dominios estructurales: un dominio N-terminal de unión a caspasa CARD (*Caspase-recruiting Domain*), un dominio central de unión a nucleótidos similar al dominio encontrado en la proteína CED4 y un dominio C-terminal que contiene de 12 a 13 motivos WD40 (Smith *et al.*, 1999) (Figura 3). Estudios de mutagénesis han revelado que la unión de Cit c tiene lugar en el dominio WD40. El dominio CARD de Apaf-1 sólo puede actuar como un centro de anclaje de PC9 cuando Apaf-1 oligomeriza en presencia de Cit c y dATP. En presencia de Cit c y dATP, Apaf-1 oligomeriza formando un complejo de entre 700 kDa y 1,4 MDa, que recluta y activa la forma zimógeno de procaspasa 9 (PC9) a través de los dominios CARD de ambas moléculas. PC9 es una caspasa iniciadora que se activa por proteólisis autocatalítica al aumentar su concentración local en el complejo formado por Apaf-1. Caspasa 9 activa unida al apoptosoma funciona como un holoenzima que procesa a otras caspasas ejecutoras como las procaspasas 3, 6, y 7 (Rodríguez *et al.*, 1999). Las caspasas ejecutoras a su vez activan a otras caspasas y además tienen sustratos celulares. En células, antes de la salida de Cit c de la mitocondria, Apaf-1 permanece en forma inactiva o cerrada en la que el dominio WD40 bloquea al dominio CARD como mecanismo de autorregulación negativa (Srinivasula *et al.*, 1998, Hu *et al.*, 1998a, Adrain *et al.*, 1999). Cit c induce un cambio conformacional en Apaf-1 a una conformación abierta que expone una superficie de oligomerización y que desenmascara el dominio CARD (Figura 2).

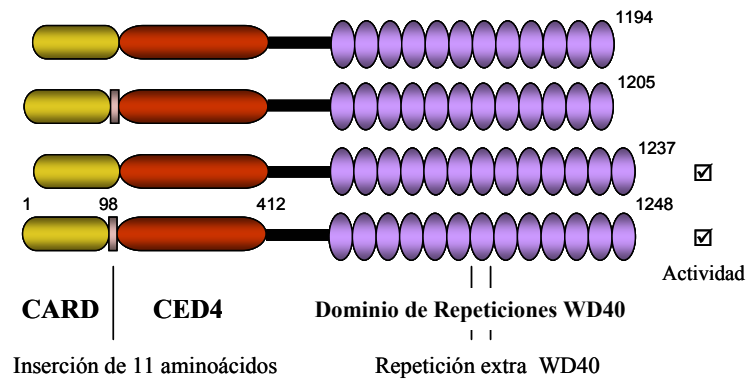


**Figura 2. Modelo de actividad del apoptosoma.** Papel de los dominios de Apaf-1 en el proceso de oligomerización. Apaf-1 normalmente adopta una conformación autoinhibida en células, en la que el dominio CARD (N) se encuentra rodeado por los dominios WD40 (C). La unión de Cit c a los dominios WD40 desplaza al dominio CARD, y Apaf-1 puede unir ATP o dATP. Tras la unión del nucleótido, tiene lugar un segundo cambio conformacional que permite la oligomerización de Apaf-1 para formar el apoptosoma.

## Introducción

La unión del ATP a Apaf-1 en esta conformación abierta es posible, e induce un segundo cambio conformacional en Apaf-1 que induce su oligomerización para formar el apoptosoma (Jiang *et al.*, 2000).

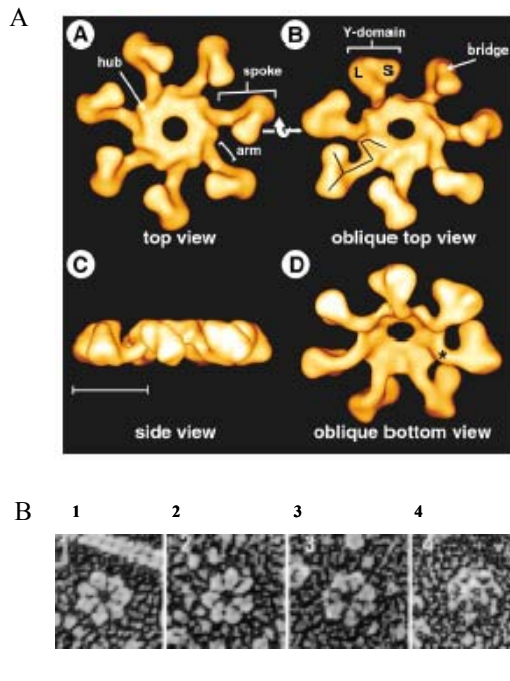
Se han descrito cuatro isoformas de Apaf-1, que se diferencian por la presencia o ausencia de dos secuencias: una inserción de 11 aminoácidos entre el dominio CARD y el dominio CED4, y un dominio WD40 adicional entre las repeticiones 5 y 6. El dominio WD40 adicional es necesario para la unión de Cit c y la activación de PC9 (Benedict *et al.*, 2000) (Figura 3).



**Figura 3. Dominios estructurales e isoformas de Apaf-1.** Apaf-1 está compuesto por tres dominios estructurales: el dominio CARD de unión a caspasa, el dominio de homología a CED4 o dominio de unión a nucleótidos, y el dominio de repeticiones WD-40. Las isoformas de Apaf-1 se diferencian por contener en su secuencia una inserción de 11 aminoácidos entre los dominios CARD y CED4 y un dominio adicional WD40. Las isoformas de Apaf-1 conteniendo la repetición WD40 adicional son las formas capaces de activar caspasas dependiente de Cit c. La isoforma mas larga de las cuatro conteniendo ambas inserciones tiene 1248 aminoácidos y se le denomina Apaf-1-XL.

La composición, estequiometría exacta y la estructura del apoptosoma no se conocen con exactitud. Mediante técnicas de cristalografía y de espectroscopia de resonancia magnética nuclear se ha resuelto la estructura del dominio CARD de Apaf-1 y de un complejo formado por los dominios CARD de Apaf-1 y PC9 (Qin *et al.*, 1999, Zhou *et al.*, 1999). Estas estructuras revelan la existencia de dos superficies complementarias con un alto número de residuos cargados y cuya red de interacciones intermoleculares determina la especificidad de la unión de ambas moléculas. Mediante crio-microscopía electrónica se ha resuelto la estructura del apoptosoma a nivel de 27Å (Acehan *et al.*, 2002). En este estudio se propone además un

modelo de la estructura tridimensional del apoptosoma en el que se predice la existencia de una hendidura central formada por los siete monómeros de Apaf-1, donde se uniría PC9. (Figura 4). Los dominios CED4 mantendrían la estructura del oligómero unida y desde la hendidura central se extenderían proyectándose hacia el exterior, conectados a través del dominio CED4, siete ejes formados por los dominios WD40. Los tallos formados por los dominios WD40 adoptarían una estructura con dos lóbulos en forma de Y, uno mayor formado por 7 hojas  $\beta$ , y el menor por 6 hojas  $\beta$ . Caspasa 9 activa, al igual que el resto de caspasas, consta de un doble heterodímero en cual se asocian una subunidad mayor y otra menor, contribuyendo ambas a la formación del centro activo en la enzima madura. Pero según los estudios de cristalografía, a diferencia de otras caspasas, solo se forma un centro activo en uno de los dímeros. Es posible que las unidades de caspasa 9 tengan cierta movilidad, pudiendo encontrarse libres en disolución o unidas al apoptosoma, y siendo catalíticamente activas sólo asociadas al complejo.



**Figura 4. Modelo tridimensional del apoptosoma a resolución de 27Å obtenido mediante técnicas de criomicroscopía electrónica.** (A) Estructura tridimensional del apoptosoma. Los dominios CARD de siete moléculas de Apaf-1 se encuentran unidos formando parte de un surco central desde el que se proyectan siete ejes formados por los dominios WD40. Estructura de partículas del apoptosoma vistas girando sobre su eje horizontal. (B) Micrografías electrónicas del apoptosoma. (1-4) Apoptosoma oligomerizado en el que se puede apreciar su estructura en forma de rueda de siete ejes con un surco central. (9) Dos apoptosomas conteniendo caspasa 9 y vistos de perfil, se encuentran unidos y enfrentados. Las flechas señalan a cada apoptosoma y entre los dos apoptosomas, se aprecia la presencia de proteínas que podrían corresponder a caspasa 9 (tomado de Acehan *et al.*, 2002).

Este modelo prevé la unión de una molécula de Cit c por cada molécula de Apaf-1, mientras que estudios de polarización de la fluorescencia indican una estequiometría 2:1 Cit c: Apaf-1 (Purring-Koch *et al.*, 1999). El mecanismo de activación de PC9 es complejo pero el primer

## Introducción

corte proteolítico que sufre PC9 se realiza autocatalíticamente en Asp<sup>315</sup> para dar lugar a una subunidad mayor de 35 kDa y una menor de 12 kDa.

Los estudios de composición del apoptosoma han revelado, mediante técnicas de filtración en gel, la existencia de dos tipos de complejos: uno proteolíticamente activo de ~ 700 kDa, capaz de activar caspasas 3 y 7 y otro complejo relativamente inactivo de ~1,4 MDa (Cain *et al.*, 1999, 2000). Los estudios de criomicroscopía electrónica indican que los apoptosomas en presencia de PC9 tienen una mayor tendencia a la agregación, por lo que el apoptosoma de 1,4 MDa podría estar formado por dos apoptosomas de 700 kDa enfrentados y unidos por interacciones entre moléculas de caspasa 9. No se conoce con exactitud su función en células.

Inicialmente se describió al apoptosoma como complejo iniciador de la ruta de las caspasas. En la actualidad existe cierta controversia en cuanto a si el apoptosoma es el verdadero iniciador de la apoptosis mitocondrial o tal vez su papel sea la de actuar como “amplificador” de la señal apoptótica.

### 1.6. Mecanismos adicionales de regulación del apoptosoma

Se han descrito un número de niveles de regulación del apoptosoma adicionales. Experimentos *in vitro* han demostrado que los niveles celulares de iones K<sup>+</sup> inhiben la apoptosis y en particular la oligomerización de Apaf-1 para formar el apoptosoma, posiblemente funcionando como mecanismo de seguridad antiapoptótico (Cain *et al.*, 2001a). Esta inhibición es neutralizada por Cit c posiblemente por competencia con los iones K<sup>+</sup> por la unión por Apaf-1. Las Hsp (*heat shock proteins*) son una familia de proteínas que se activan en respuesta a estrés y tienen como función proteger a la célula. Se ha demostrado que varias proteínas Hsp inhiben la formación del apoptosoma mediante varios mecanismos. Hsp70 se une al dominio CARD de Apaf-1 inhabilitándolo para unir PC9. (Beere *et al.*, 2000, Saleh *et al.*, 2000). Además Hsp 70 tiene un doble papel antiapoptótico al unirse e inhibir a AIF. Hsp 90 y Hsp 27 también inhiben la activación de apoptosis en respuesta a estrés, a través de la inhibición del apoptosoma. Hsp 90 se une a Apaf-1 impidiendo su oligomerización (Pandey *et al.*, 2000), y Hsp 27 se une y secuestra a Cit c y PC3 (Bruey *et al.*, 2000, Concannon *et al.*, 2001).

La ruta intrínseca de la apoptosis también se regula por una familia de proteínas llamadas

IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) (Deveraux *et al.*, 1999). Se conocen algo más de media docena de proteínas IAPs; XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, BRUCE, ML-IAP. Las IAPs son una familia de proteínas, inicialmente identificadas en baculovirus, como capaces de paralizar la maquinaria apoptótica de la célula huésped en respuesta a la infección. Todas ellas contienen al menos un dominio de repetición baculoviral (BIR). Las IAPs ejercen su acción mediante la inhibición de la activación y la actividad de las caspasas activas. XIAP, IAP1, IAP2 se unen a PC9 impidiendo su procesamiento y activación. En particular XIAP ejerce su actividad antiapoptótica por varios mecanismos que implican distintas partes de la anatomía de la molécula. XIAP inhibe las caspasas 3 y 7 mediante interacción de sus dominios BIR1 y BIR2. Caspasa 9 es inhibida por XIAP sólo cuando ésta se encuentra en su forma procesada en el apoptosoma, ya que XIAP interacciona con caspasa 9 a través del motivo de unión a BIR3: ATPF. El dominio ATPF es el péptido de unión de la subunidad pequeña de caspasa 9, p12. Este dominio se expone cuando PC9 es procesada en Asp<sup>315</sup>, por lo que parece que esta inhibición representa un “mecanismo de seguridad” adicional para impedir una posible actividad del apoptosoma en condiciones inadecuadas. La liberación de SMAC de la mitocondria tiene como consecuencia la neutralización de la inhibición de caspasa 9 por XIAP ya que SMAC es capaz de unirse a XIAP a través de su dominio BIR 3 desplazando al motivo ATPF (Chai *et al.*, 2000, Srinivasula *et al.*, 2001a, Wu *et al.*, 2000). Además, estudios estructurales indican que, de forma adicional, XIAP impide la homodimerización de caspasa 9 al interaccionar con caspasa 9 formando un heterodímero a través de otra superficie de unión distinta de ATPF y por tanto, manteniendo secuestrada a caspasa 9 monomérica (Shiozaki *et al.*, 2003). Es probablemente que XIAP se una al apoptosoma interaccionando con las ambas caspasas; con caspasa 3 (a través de su dominio BIR 2) y caspasa 9 (a través del dominio BIR3).

Introducción

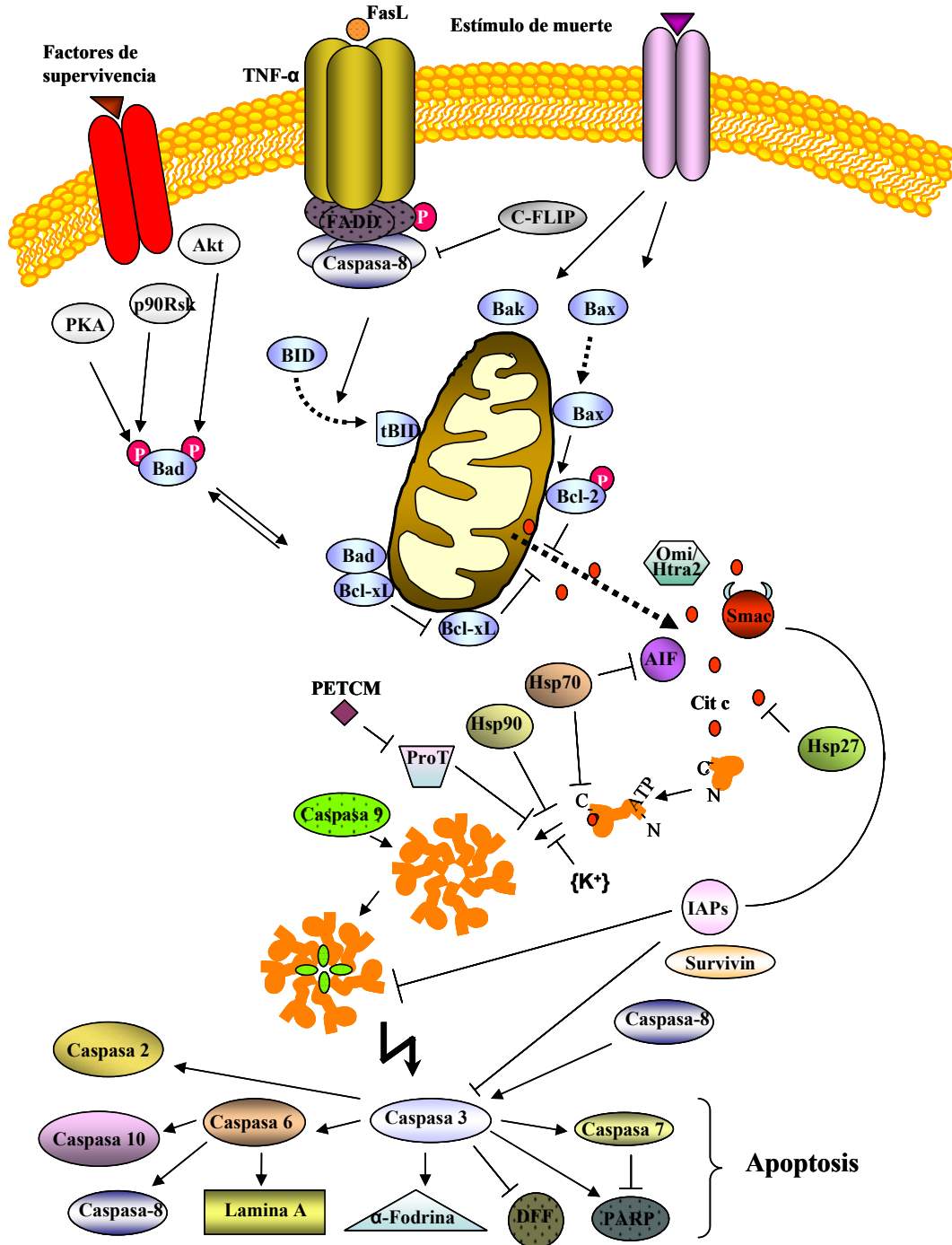


Figura 5. Regulación de la de activación de caspasas a través de la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial.

Cuando el apoptosoma está formado y activa a PC3, ésta puede unirse al complejo y amplificar el procesamiento de caspasa 9 catalizando un corte proteolítico en Asp<sup>330</sup>. De esta manera se elimina el dominio ATPF y se crea un “feed-back” positivo de actividad del apoptosoma.

Otros mecanismos de regulación de la apoptosis mediada por Cit c apuntan al ATP como vía de regulación del apoptosoma, ya que se ha observado que los requerimientos de ATP por el apoptosoma varían en distintas condiciones experimentales y podrían existir proteínas que modulasen la acción del apoptosoma a nivel de la unión de nucleótidos. No obstante, no se conocen los mecanismos que regulan la actividad del apoptosoma a este nivel.

Quedan puertas abiertas al descubrimiento de mecanismos de regulación del apoptosoma adicionales, en los que podrían participar proteínas desconocidas en la actualidad, o asignarse nuevas funciones a proteínas ya conocidas.

### **1.7. Apoptosis y enfermedad: vía mitocondrial y apoptosoma**

Dado que la muerte celular programada participa en procesos esenciales para el funcionamiento del organismo, los defectos en rutas metabólicas que conducen a la apoptosis tienen un papel importante en el desarrollo de patologías (Tabla 1, Thompson 1995, Cameron *et al.*, 2000, Reed, 2002, Ferraro *et al.*, 2003, Hajra *et al.*, 2004). A medida que se han ido caracterizando los componentes de la maquinaria apoptótica, se ha podido establecer su conexión con las bases moleculares de las patologías, y se han asociado muchas de ellas a alteraciones en la expresión o la función de proteínas clave reguladoras. Un exceso de apoptosis origina enfermedades degenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades que cursan con daño tisular debido a isquemia (Martin, 1999, Yuan, 2000). En el infarto de miocardio, el daño isquémico renal o el accidente cerebro vascular, las células que rodean a la zona isquémica mueren por apoptosis (Czerski, 2004). En la enfermedad asociada a la infección por el virus del sida (VIH), los linfocitos T (CD4+) mueren por apoptosis (Garden *et al.*, 2002, Badley *et al.*, 2003). Dado que la apoptosis juega un papel muy importante en el funcionamiento del sistema inmunológico, su carencia puede ser causa de inmunodeficiencias o de enfermedades autoinmunes, siendo

## Introducción

responsable por tanto de infecciones virales, SIDA, hepatitis agudas o crónicas, cirrosis, o del rechazo de transplantes. La hematopoyesis también puede verse afectada por alteraciones en la apoptosis produciendo cuadros como el de la anemia aplásica, la neutropenia crónica, síndromes mielodisplásicos, etc. También se ha encontrado relación entre una apoptosis excesiva y enfermedades hematológicas, algunos tipos de alergia, y daño en hígado y riñón (Kornblau, 1998, Cain y Freathy 2001b, Kitada *et al.*, 2002). Entre las enfermedades asociadas con una inhibición de la apoptosis se encuentran las enfermedades proliferativas; el cáncer y las enfermedades autoinmunes.

**Tabla 1. Enfermedades asociadas con la apoptosis**

---

### APOPTOSIS INSUFICIENTE

- Cáncer: Colorrectal, Glioma, Hígado, Neuroblastoma, Leucemias, Linfomas, y Próstata. Resistencia a quimioterapia, inmunoterapia y radiación. Acumulación celular
- Autoinmunidad: Miastenia gravis, Lupus eritematoso sistémico, Artritis reumatoide, Enfermedades renales (glomerulonefritis), Esclerosis múltiple. Fallo al eliminar linfocitos autorreactivos
- Estenosis: Acumulación de células de músculo liso en las paredes de las arterias
- Infecciones persistentes: Fallo en la erradicación de virus o bacterias (adenovirus baculovirus)
- Enfermedades inflamatorias: Asma bronquial Enfermedad inflamatoria intestinal. Inflamación pulmonar

### APOPTOSIS EXCESIVA

- Neurodegeneración: Enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, y esclerosis lateral amiotrófica Retinitis pigmentosa, Epilepsia
- Isquemia- reperfusión: La apoptosis se presenta pero aparece también necrosis
- Infarto de miocardio: Pérdida de miocardiocitos
- Rechazo a transplantes
- Inflamación
- Osteoartritis: pérdida de condrocitos
- Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (VIH): Depleción de linfocitos T
- Infección bacteriana
- Diabetes tipo I: destrucción de islotes de Langerhans por el sistema inmune
- Traumatismos: lesiones medulares, lesiones cerebrales
- Daño tisular
- Accidente cerebrovascular
- Daño isquémico renal: Riñón poliquístico
- Enfermedades hematológicas: Anemia aplásica, Síndrome mielodisplásico, Linfocitopenia T CD4+ Deficiencia G6PD
- Enfermedades oftalmológicas
- Alopecia



Un gran número de investigaciones demuestran una correlación entre la inhibición de la apoptosis y la malignización celular y se ha comprobado que un amplio grupo de terapias antineoplásicas inducen apoptosis en la célula tumoral. En la actualidad, la expresión de algunos genes antiapoptóticos (oncogenes) como Bcl-2 se considera un factor de peor pronóstico para diversos tipos de cáncer.

Las alteraciones en la formación del apoptosoma también se han asociado con patologías humanas. En el síndrome de la deficiencia de adenosin deaminasa (ADA) la acumulación de nucleótidos parece ser la responsable de la activación de la ruta mitocondrial de la apoptosis que tiene lugar en esta enfermedad.

Estudios acerca de la expresión de Apaf-1 en tumores, y estudios mecanísticos en modelos celulares indican que la vía intrínseca y el apoptosoma son importantes para el desarrollo y la progresión del cáncer. Se ha demostrado que en los melanomas malignos falla la expresión de Apaf-1 (Soengas *et al.*, 2001) ya que existe pérdida de heterocigosidad en el locus génico de Apaf-1 e inactivación del segundo alelo por metilación. Asimismo, la frecuencia de pérdida de Apaf-1 es mayor en melanomas metastáticos que en melanomas primarios (Fujimoto *et al.*, 2004). También se ha descrito pérdida alélica de la región que contiene el locus de Apaf-1 (en humanos 12q23) en adenocarcinoma pancreático ductal, en glioblastoma (Watanabe *et al.*, 2003) y leucemia (Jia *et al.*, 2001). También se han observado mutaciones que alteran la pauta de lectura del gen Apaf-1 en cancer gastrointestinal (Yamamoto *et al.*, 2000) y deleciones o proteína inactiva en otras líneas celulares (Kimura *et al.*, 1998). La expresión de Apaf-1 está controlada por p53 a través del factor transcripcional E2F (Fortín *et al.*, 2001). Las alteraciones en la regulación transcripcional y post-transcripcional de Apaf-1 se han asociado con otros tipos de cáncer. En células de cáncer de ovario se ha correlacionado la quimiorresistencia que presentan los tumores con una actividad deficiente del apoptosoma (Wolf *et al.*, 2001). Estudios dirigidos a restaurar los niveles de Apaf-1 en diversas líneas tumorales han correlacionado con una pérdida en la quimiorresistencia característica de estas líneas (Kamarajan *et al.*, 2001, Ogawa *et al.*, 2001). También se han relacionado con procesos tumorales las alteraciones en la expresión de proteínas que regulan la formación y actividad del apoptosoma, como las Hsp, Pro T, XIAP, ML-IAP y Akt, (Apartado 1.6.).

## Introducción

La inhibición de la apoptosis cobra especial importancia en el caso de las enfermedades neurodegenerativas ya que, aunque no la única, es una de las formas principales de muerte neuronal (Friedlander *et al.*, 2003). La apoptosis es una característica tanto de las enfermedades neurológicas agudas como crónicas. La necesidad de inhibir la muerte neuronal y sus causas se agrava por la escasa o nula capacidad regenerativa que tiene el sistema nervioso central. En un proceso agudo, como una lesión traumática, tras la isquemia, la necrosis y la apoptosis coexisten. La necrosis se encuentra en el centro de la lesión, donde la hipoxia es más severa, pero en las zonas de penumbra aparece flujo sanguíneo lateral y se crea un gradiente de tejido perfundido donde se establece un umbral de muerte por apoptosis (Rabuffetti *et al.*, 2000, Benchoua *et al.*, 2001). En las enfermedades neurodegenerativas crónicas la apoptosis es la forma principal de muerte neuronal (Li *et al.*, 2000, Ona *et al.*, 1999). Hay evidencia de que las caspasas tienen un papel importante en esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Parkinson, Huntington, Alzheimer y demencia asociada a infección por VIH (Gervais *et al.*, 1999, Garden *et al.*, 2002). En fases tempranas se crea una activación de caspasas subletal que crea la disfunción celular. Aunque la causa que origina estas enfermedades no se conoce con exactitud, se ha encontrado activación de caspasas tanto en fases tardías de las enfermedades como en la pérdida de sinapsis neuronales tempranas. Por otro lado, en un tejido donde las células mueren por apoptosis, existe un fenómeno de contagio en el que una célula que sufre apoptosis, produce moléculas de señalización de muerte celular que difunden y que inducen apoptosis en células vecinas, creando un efecto dominó de expansión de muerte celular o “kindergarten effect” (Li *et al.*, 2000). Este fenómeno de apoptosis contagiosa ocurre tanto en procesos agudos como crónicos y es importante desde el punto de vista terapéutico antiapoptótico, porque un inhibidor de apoptosis no solo retrasará la muerte de una neurona particular sino que también puede inhibir los factores difusibles tóxicos de apoptosis en neuronas vecinas.

Según estudios preclínicos en modelos animales de enfermedades, la inhibición de caspasas resulta una terapia prometedora en ELA, enfermedad de Parkinson, lesiones cerebrales traumáticas y epilepsia, meningitis bacteriana y sepsis y en modelos de lesión de isquemia-reperusión, (cardíaco, hepático, intestinal, renal y cerebral) (Nicholson 2000). Muchas compañías farmacéuticas están desarrollando nuevas generaciones de inhibidores de caspasas suficientemente potentes y capaces de atravesar la membrana de las células (Vertex/Avantis

Pharma, Vertex/Serono, Merck Frosst, SmithKline Beecham, BASF, Idun Pharm, Novartis Vertex). Algunas de los compuestos desarrollados por estas compañías se encuentran en ensayo en fases clínicas I, y II (Onteniente *et al.*, 2004). Por ejemplo, la minociclina es una tetraciclina de segunda generación que tiene notables propiedades neuroprotectoras que inhibe la activación de caspasas. Se está evaluando en pacientes con ELA, enfermedad de Huntington, y se están diseñando ensayos clínicos en pacientes con Alzheimer (Zhu *et al.*, 2002, Wang, *et al.*, 2003). En conclusión, los datos existentes que relacionan la actividad entre caspasas y neurodegeneración indican que la inhibición del apoptosoma jugaría un papel importante ya que se inhibiría la activación de PC9, y por tanto de las caspasas ejecutoras. En general, las aplicaciones clínicas de compuestos inhibidores de Apaf-1 estarían sujetas a las mismas consideraciones que los inhibidores de caspasas. Se ha demostrado la implicación de la vía mitocondrial y el apoptosoma en un gran número de patologías. Existen numerosos estudios *in vivo* que indican que el apoptosoma es responsable de la muerte celular patológica en distintos tipos de neuronas y que representa una diana terapéutica antiapoptótica de interés. Así por ejemplo, en algunos estudios se ha utilizado el dominio CARD de Apaf-1 ya que actúa como inhibidor dominante negativo de su función impidiendo la formación de un apoptosoma funcional (Qin *et al.*, 1999). La sobreexpresión de este dominio mediante la utilización de vectores virales, tiene como consecuencia la inhibición de la apoptosis *in vivo* inducida por neurotoxinas en un modelo de Parkinson. Por ello se ha propuesto la utilización de este dominio como estrategia en terapia génica apoptótica antimitocondrial (Mochizuki *et al.*, 2001). Otros experimentos muestran inhibición de la apoptosis inducida por axotomía en células de retina de ratón mediante el silenciamiento del gen de Apaf-1 utilizando siRNAs (Lingor *et al.*, 2005).

No obstante, aunque los procesos que contribuyan a inhibir la muerte neuronal mediada por caspasas son dianas terapéuticas importantes, en el futuro se tendrá que evaluar en pacientes si terapias antiapoptóticas retrasan la muerte celular y conservan las neuronas pero no recuperan su función. El futuro de los estudios debe ir encaminado tanto a documentar nuevas asociaciones entre apoptosis y enfermedad como a desarrollar nuevas terapias basadas en la modulación de la apoptosis. En este sentido, enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, procesos autoinmunes o infecciones víricas parece evidente que van a

## Introducción

beneficiarse de forma inmediata de estos trabajos, aun cuando a medio y largo plazo la regulación de la apoptosis se presenta como una de las armas más prometedoras en medicina.

En relación a los antecedentes que existen en la actualidad acerca de moduladores artificiales del apoptosoma, investigaciones recientes han identificado tres clases de moléculas que directa o indirectamente modulan la actividad del apoptosoma y que podrían tener una proyección terapéutica (Cain, 2003). Los tres tienen en común el haberse identificado mediante la utilización de colecciones de compuestos y ensayos en extractos celulares. El compuesto PETCM se identificó a partir del cribado de quimiotecas de compuestos orgánicos como activador de caspasa 3 en extractos (Jiang *et.al.*, 2003). PETCM estimula la activación del apoptosoma inhibiendo la proteína ProT (protimosina), una oncoproteína que actúa como regulador negativo de la formación del apoptosoma. Otros compuestos también identificados mediante el cribado de quimiotecas utilizando ensayos en extractos, activan la formación del apoptosoma, aparentemente disminuyendo los umbrales de Cit c requeridos para la formación del apoptosoma (Nguyen *et. al.*, 2003). Estos compuestos han demostrado ser efectivos en la inducción química de la apoptosis en un amplio espectro de líneas celulares. Finalmente, también se han encontrado moléculas que actúan como inhibidores de la formación del apoptosoma. Una familia de diarilureas han demostrado ser inhibidores efectivos de la activación de caspasas en extractos celulares y aunque su mecanismo de acción no se conoce, provocan la inhibición de la formación del apoptosoma de 700 kDa (Lademann *et.al.*, 2003).

## 1.8. Objetivos

La apoptosis es probablemente uno de los procesos biológicos cuya caracterización mayor atención ha recibido en los últimos años. En paralelo con el proceso de caracterización del mecanismo molecular, la investigación también se ha dirigido hacia la identificación de moléculas moduladoras del proceso. En este sentido el interés es doble, dichas moléculas pueden servir como herramientas biológicas muy útiles para el estudio en profundidad del mecanismo molecular y pueden, a su vez, derivar en moléculas con potencial aplicación terapéutica. En la actualidad, no existen citas en la literatura que describan la identificación de moduladores artificiales del apoptosoma, que interaccionen físicamente con el complejo, e interfieran con alguno de los pasos necesarios para su formación y actividad. Dado el potencial terapéutico que tiene la inhibición de caspasas, la inhibición de su activación sería incluso más deseable, por lo que el apoptosoma se presenta como una diana terapéutica de gran interés.

Una estrategia común en el diseño de moduladores de enzimas es el modelado molecular de los bolsillos de unión a sus sustratos, o de interacción con moduladores naturales, utilizando la información estructural disponible. En el futuro la disponibilidad de mayor información estructural del apoptosoma brindará nuevas oportunidades en el diseño racional de moduladores que inhiban o activen el complejo y por tanto la activación de caspasas. En la actualidad la información disponible acerca de la estructura de las interacciones entre los componentes del apoptosoma es insuficiente como para abordar programas de identificación de moléculas basados en su estructura. Por ello, la búsqueda de moduladores del apoptosoma se basa en el desarrollo de ensayos de alto rendimiento que permitan analizar su actividad frente a un gran número de compuestos. Este tipo de estudios se deben abordar mediante una integración de técnicas químicas y de biología molecular ya que es necesaria la obtención de las proteínas diana, la puesta a punto del ensayo biológico y el cribado de quimiotecas. El objetivo general, es la utilización de la Química Combinatoria para la identificación de moléculas de interés biomédico. Para ello, en primer lugar es necesario poner a punto un ensayo que permita utilizar dianas terapéuticas que permita el cribado funcional de un elevado número de moléculas con el objetivo de identificar efectores artificiales del sistema Apaf-1-caspasas. El trabajo presentado en esta tesis incorpora como novedad la utilización de los componentes básicos recombinantes

## Introducción

purificados del apoptosoma y la reconstitución de su actividad *in vitro* para el cribado. Con este ensayo y formato de cribado, lo que se pretende es una mejor definición de la diana molecular de búsqueda de moléculas moduladoras. Por otro lado, la posibilidad de manipulación de los distintos componentes del apoptosoma en las reacciones de reconstitución permitiría diseccionar el mecanismo de acción de posibles moduladores y su sitio de unión.

Para abordar este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1 Expresión de la proteína Apaf-1 utilizando el sistema de baculovirus y células de insecto y puesta a punto de un ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro*.
- 2 Cribado de quimiotecas para la identificación de moduladores de la formación del apoptosoma y diseño racional de moduladores.
- 3 Caracterización molecular del mecanismo de inhibición y estudio *in vivo* de los compuestos identificados.

## 2. Reconstitución *in vitro* del Apoptosoma

---

El ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro* y activación de PC9 fue descrito en la literatura por primera vez en 1997 por el grupo de investigadores que identificó la proteína Apaf-1 como homólogo de la proteína CED-4 de *C. elegans* (Zou *et al.*, 1997). Se demostró que Apaf-1, Cit c y PC9 eran los componentes fundamentales del apoptosoma y que incubando las tres proteínas recombinantes purificadas, en presencia de ATP ó dATP se podía reproducir el procesamiento y la activación de caspasas *in vitro* (Li *et al.*, 1997, Zou *et al.*, 1999). Desde su descripción hasta la actualidad, el ensayo se ha utilizado en el estudio de los mecanismos que regulan la formación y actividad del apoptosoma *in vitro* (Zou *et al.*, 1999, 2003). También se ha utilizado en el estudio de la naturaleza de la interacción entre Cit c y Apaf-1 (Yu, *et al.*, 2001) así como en el análisis de la interacción con proteínas que regulan la actividad del apoptosoma tales como Smac/DIABLO, IAPs (Chai *et al.*, 2000) Hsp 70 (Beere *et al.*, 2000), o Hsp 90 (Pandey *et al.*, 2000). Sin embargo, a raíz del descubrimiento y caracterización de apoptosomas de distinto tamaño y actividad identificados en modelos celulares se planteó la duda por parte algunos autores (Cain *et al.*, 1999, 2000) sobre si los apoptosomas que se forman mediante reconstitución *in vitro* representarían un fiel reflejo de lo que ocurre *in vivo*, sugiriendo en algún caso que la mayoría de los apoptosomas que se forman durante la reconstitución *in vitro* son inactivos y de gran tamaño: 1,4 MDa.

Por otro lado se suscitó una polémica en torno al ensayo durante la identificación de las distintas isoformas de Apaf-1. La secuencia del clon de Apaf-1, publicada en el artículo que describe el ensayo originalmente en la revista Cell (Li *et al.*, 1997) en GenBank<sup>TM</sup> con número de acceso AFO13263, como responsable de la activación de procaspasa *in vitro* resultó ser una forma inactiva de Apaf-1. Diversos autores publicaron menciones acerca de la imposibilidad de la manipulación de esa proteína *in vitro* debido a su insolubilidad (Saleh *et al.*, 1999). Posteriormente se describieron tres isoformas adicionales de Apaf-1. La caracterización de su actividad y expresión en tejidos asignó a la primera isoforma descrita por Li *et al.*, el papel de

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

proteína inactiva y posiblemente el de actuar como antagonista de la activación de caspasas (Benedict *et al.*, 2000).

Como base para la identificación de moléculas cabeza de serie a partir del cribado de quimiotecas combinatorias, para la caracterización molecular de los compuestos definidos, así como para el análisis de moléculas surgidas del diseño racional, se planteó la puesta a punto del ensayo de reconstitución *in vitro* del apoptosoma.

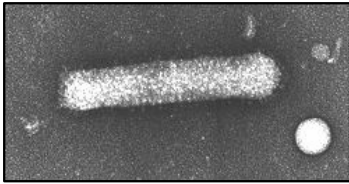
Para obtener Apaf-1 activa en cantidades suficientes para realizar ensayos funcionales, en nuestro laboratorio se puso a punto la expresión de Apaf-1-XL en el sistema de expresión con baculovirus y células de insecto. La producción de la proteína Apaf-1, debido fundamentalmente a su gran tamaño, sólo se había llevado a cabo con éxito en el sistema de expresión en baculovirus, pudiéndose expresar en sistemas procarióticos solo fragmentos o dominios de la misma.

### **2.1. Introducción a la Baculovirología**

Los baculovirus (familia *baculoviridae*) son uno de los vectores de expresión eucariotas más potentes y versátiles y se han utilizado ampliamente para expresar genes en cultivos de tejido de células de insecto y en larvas de insecto (Luckow 1993a, Davies 1994). La cepa más conocida y estudiada de los baculovirus es el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). AcNPV tiene un genoma de DNA de doble cadena de 130 Kb, circular, superenrollado y que se empaqueta en una cápsida baciliforme. Los baculovirus salvajes exhiben dos tipos de ciclos: ciclo lítico y ciclo ocluido. Estos dos ciclos se desarrollan independientemente a lo largo de tres fases de la replicación del virus. La fase temprana comienza a las 0,5-6 horas tras la infección. Incluye los procesos de adherencia y penetración en el interior celular, desensamblaje del virus, expresión de genes tempranos y bloqueo de la maquinaria de expresión de la célula hospedadora. En la fase siguiente se producen viriones que salen al exterior celular envueltos en membrana plasmática y proteína gp64 necesaria para internalizarse en otras células por endocitosis. La mayoría de estos virus se producen entre las 18-36 horas y comienzan un segundo ciclo de replicación en nuevos tejidos. En las fases más tardías de su ciclo (24-96 horas post-infección), los viriones se encapsidan en una matriz



proteica homogénea llamada polihedron, que está compuesta básicamente por una única proteína llamada polihedrina. Esta proteína se acumula en altas cantidades en las células infectadas formando cuerpos de oclusión para proteger a los virus de las condiciones ambientales en la naturaleza, pero no es esencial para el ciclo infeccioso del virus en condiciones de cultivo *in vitro*. Los genes heterólogos colocados bajo el control transcripcional del promotor de polihedrina del virus AcNPV se expresan fuertemente durante las fases más tardías de la infección.



**Figura 6. *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV).** Micrografía electrónica de un virión teñido negativamente. Se pueden apreciar la estructura asimétrica de la cápside y la presencia de una envuelta lipídica con proyecciones en la superficie (tomado de <http://meds.queensu.ca/~carstens/baculovirus/baculovirus.html>).

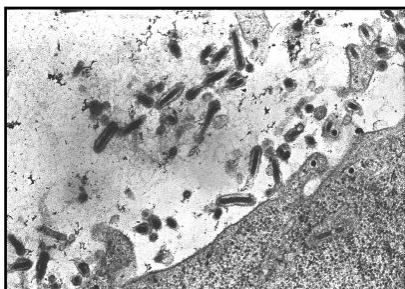
Varias son las características que distinguen el sistema de expresión en vectores de baculovirus de otros sistemas de expresión:

- El sistema admite grandes inserciones debido a la capacidad de expansión de la cápside del virus, por lo que permite expresar proteínas de gran tamaño.
- Se alcanzan niveles altos de expresión del gen heterólogo en comparación con otros sistemas de expresión eucarióticos, especialmente para proteínas intracelulares.
- Es posible la expresión múltiple de genes. La expresión de complejos hetero-oligoméricos de proteínas se puede llevar a cabo con la infección simultánea de varios virus sobre la misma célula, conteniendo dos o más cassettes de expresión cada uno.
- Los baculovirus tienen un rango de hospedador limitado solamente a especies de invertebrados específicas. Estos virus son más seguros para trabajar que los virus de mamíferos ya que no infectan a vertebrados.
- AcNPV se propaga en líneas celulares de insecto, algunas de las cuales son capaces de crecer en cultivo líquido en suspensión permitiendo la producción a gran escala de proteína recombinante.

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

- En muchos casos las proteínas son procesadas y correctamente plegadas. La mayoría de las modificaciones post-traduccionales ocurren de manera idéntica a como ocurren en el ambiente natural de la proteína, con lo que la estructura y la funcionalidad de la proteína recombinante reproduce al máximo las características de la proteína salvaje.
- Las proteínas expresadas son transportadas a sus dianas celulares (transporte al núcleo, anclaje a membranas etc.). Asimismo las proteínas se localizan en el mismo compartimento subcelular que la proteína salvaje.
- Los baculovirus tienen la capacidad de realizar procesamiento de exones/intrones por lo que son capaces de expresar genes que requieren procesamiento de mensajero.

Tradicionalmente las técnicas de construcción de baculovirus recombinantes utilizaban métodos basados en la recombinación homóloga para insertar el gen de interés delante del promotor de polihedrina u otros. La obtención de los virus recombinantes se hacía extremadamente lenta y difícil por dos motivos. Primero, la fracción de virus recombinantes en la progenie podía llegar a ser muy baja pudiendo representar una relación de 1: 1000 virus recombinantes frente a no recombinantes. En segundo lugar, los métodos de rastreo de recombinantes hacían difícil la obtención de una población pura del virus recombinante frente al parental. Con las antiguas aproximaciones, tras transfectar el plásmido y los DNAs virales en células de insecto, se requerían sucesivos ensayos en placa para purificar los virus recombinantes de los parentales no recombinantes que pasan a ser contaminantes ahora de la progenie de virus deseados (Kitts *et al.*, 1990, 1993, Hartig *et al.*, 1992).



**Figura 7. Baculovirus AcMNPV. Micrografía electrónica que muestra una sección de una célula de insecto infectada con el baculovirus. Un gran número de viriones salen por exocitosis envueltos en membrana citoplasmática al exterior celular (tomado de <http://meds.queensu.ca/~carstens/baculovirus/baculovirus.html>)**

## **2.2. Generación de baculovirus recombinantes y expresión de Apaf-1 mediante transposición sitio-específica. Método Bac-to-Bac.**

Para optimizar la obtención de poblaciones puras de baculovirus recombinantes se desarrollaron nuevos métodos entre los que se encuentra el método Bac-to-Bac. El método se basa en la transposición dirigida del gen de interés desde el cassette de expresión en el plásmido pFastBac al vector lanzadera de baculovirus, también llamado báculo (Luckow *et al.*, 1993b).

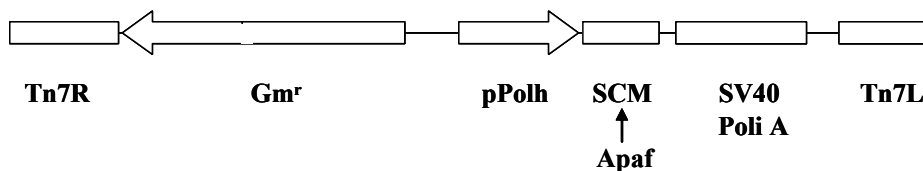
### **2.2.1. Construcción de baculovirus recombinantes de Apaf-1**

El primer paso para la construcción de los baculovirus recombinantes utilizando el sistema Bac-to-Bac es clonar el gen de interés en el vector lanzadera de la serie pFastBac apropiado, en este caso el plásmido pFast Bac 1. El cDNA de Apaf-1 se encontraba subclonado en el plásmido pCDNA 3 como proteína de fusión a una etiqueta epítipo de Myc C-terminal (Benedict *et al.*, 2000). Utilizando como molde el plásmido pCDNA3-Apaf-XL, se subclonó mediante amplificación por PCR, el cDNA de Apaf en el plásmido pFastBac 1 (apartado 5.5.2.). Los oligonucleótidos diseñados permitieron introducir la secuencia codificante para una cola de 9 histidinas en el extremo C-terminal de Apaf. Dado que los plásmidos que contenían el gen de Apaf-1 resultaron ser inestables en las cepas habituales en nuestro laboratorio, para las operaciones de manipulación del cDNA de Apaf-1-XL en los plásmidos pCDNA3 y pFastBac 1 se utilizó la cepa MAX Efficiency STBL2 (Life Technologies), derivada de *E.coli* JM109/J5. Su genotipo la hace especialmente indicada para amplificar plásmidos con insertos de gran tamaño o que contengan repeticiones, palíndromes, regiones de DNA genómico inestables, o secuencias retrovirales. Las cepas de *E. coli* que contienen la mutación *recA* son estables para amplificar y mantener la mayoría de secuencias portadas en los vectores de clonación habituales. Sin embargo, ciertas secuencias como las mencionadas anteriormente son incluso inestables en cepas *recA*. Las cepas que contienen las mutaciones *sbcB* y *cbcC* por separado, en combinación con otras mutaciones (ej. *recBC*, *recD*, *recF*, ó *recJ*), han demostrado ser útiles para estabilizar plásmidos, cósmidos, o fagos  $\lambda$  que contienen insertos con regiones palindrómicas o secuencias genómicas inestables. Se transformó el plásmido original pCDNA3-Apaf-XL en *E.coli* STBL2 y

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

se seleccionaron 12 de las colonias más pequeñas. Se aisló el DNA plasmídico de estas colonias y se utilizó para amplificar el cDNA que codifica Apaf-1 mediante PCR. Seguidamente se realizó un análisis utilizando enzimas de restricción. Este análisis permitió descartar algunas colonias cuyo patrón de restricción divergía del esperado. La secuenciación del cDNA de Apaf-1 subclonado en pFastBac 1 permitió descartar una serie de clones que contenían mutaciones hasta que finalmente se encontró un clon que contenía la secuencia correcta en su totalidad correspondiéndose con la publicada en pubmed (Nuñez AF149794).

El plásmido dador pFastBac 1 contiene un cassette de expresión que consiste en un gen de resistencia a gentamicina  $Gm^r$ , el promotor específico de baculovirus polihedrina, un sitio de clonación múltiple y los dos brazos del transposón Tn7 (Figura 8).



**Figura 8. Mapa del cassette de expresión integrado en el plásmido dador pFastBac 1.** El elemento mini-Tn7 contiene entre sus brazos izquierdo y derecho (Tn7R, Tn7L) un cassette de expresión que consiste en un gen de resistencia a gentamicina ( $Gm^r$ ), un promotor específico de baculovirus (promotor de polihedrina: pPolh), un sitio de clonación múltiple (SCM) y una señal de poliadenilación de SV40.

El cDNA de Apaf-1 subclonado en pFast Bac 1 se utilizó para transformar células DH10Bac. En el interior de estas células es donde se produce la transposición dirigida que da lugar a los baculovirus recombinantes. Las células *E.coli* DH10Bac contienen en su interior el bácido *bMON14272* (Figura 9). El bácido es una versión del genoma del baculovirus que contiene las siguientes modificaciones respecto al baculovirus salvaje:

- Un origen de replicación en *E.coli* (mini-F-replicón).
- Un gen de resistencia a kanamicina para su selección.
- Un segmento de DNA derivado del vector pUC que codifica para el péptido Lac-Z.

- La secuencia del sitio de inserción del transposón bacteriano Tn7. Esta secuencia esta insertada en el extremo N-terminal del segmento del gen codificante para el péptido LacZ, sin alterar la pauta de lectura del péptido.

El báculo se propaga en *E. coli* DH10Bac como un plásmido de alto peso molecular que confiere resistencia a kanamicina y permite la selección de clones positivos azules en presencia de un sustrato cromogénico como X-Gal o Bluo-gal y el inductor IPTG. Esto es debido a que el báculo complementa la deleción del gen LacZ existente en el genoma de *E. coli* DH10Bac.

Los báculos recombinantes se construyen transfiriendo el elemento Tn7 desde el plásmido pFastBac 1 dador al sitio de inserción *mini-attTn7* en el báculo. Las funciones de transposición son conferidas en *trans* por el plásmido auxiliar pMON7124, que codifica para una transposasa y confiere resistencia a tetraciclina. Las células DH10Bac contienen este plásmido en su interior. La transformación de células DH10Bac con el plásmido pFastBac-1-Apaf-XL se llevó a cabo por choque térmico. Las colonias que contienen báculo recombinante se identificaron mediante disrupción del gen LacZ. De esta manera, las colonias blancas se seleccionaron al cabo de dos días de incubación y se procedió a su resiembra para comprobar el color. El siguiente paso fue la extracción de DNA de alto peso molecular en la que se obtuvo como producto una mezcla de DNAs conteniendo el báculo.

Para verificar la inserción del cDNA de Apaf-1 en el báculo en las colonias seleccionadas se procedió al análisis por PCR del DNA de alto peso molecular aislado. El DNA se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa y se seccionó la banda del gel correspondiente al báculo, que migra mas despacio que la banda de 21 Kb del patrón  $\lambda$  Eco-HindIII. Se utilizó este DNA como molde para una PCR, así como una pareja de oligonucleótidos pUC/M13 que hibridan con secuencias flanqueantes del sitio de inserción *mini-attTn7* del transposón Tn7 dentro de la secuencia del gen LacZ- $\alpha$  en el báculo (Figura 10).

Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

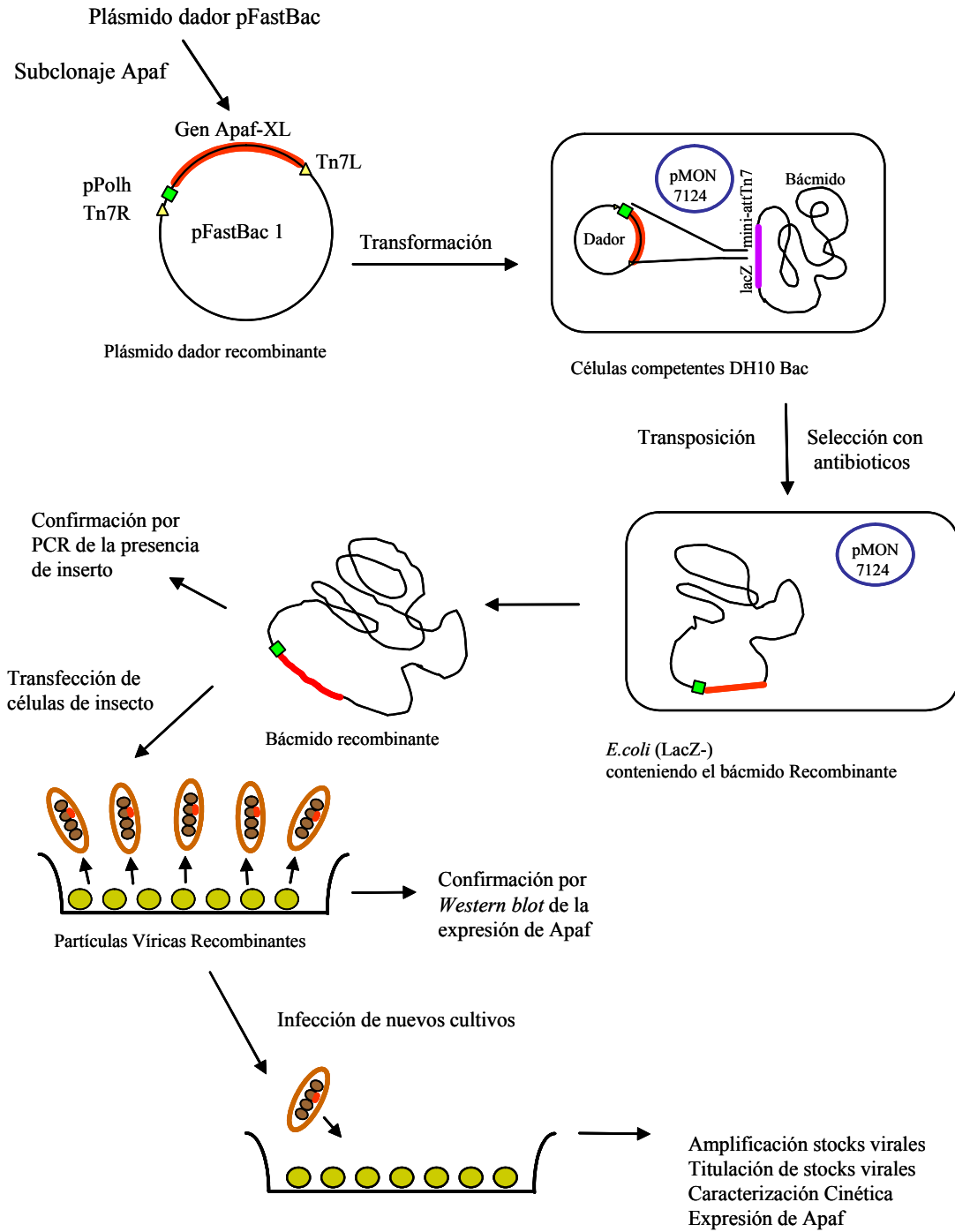
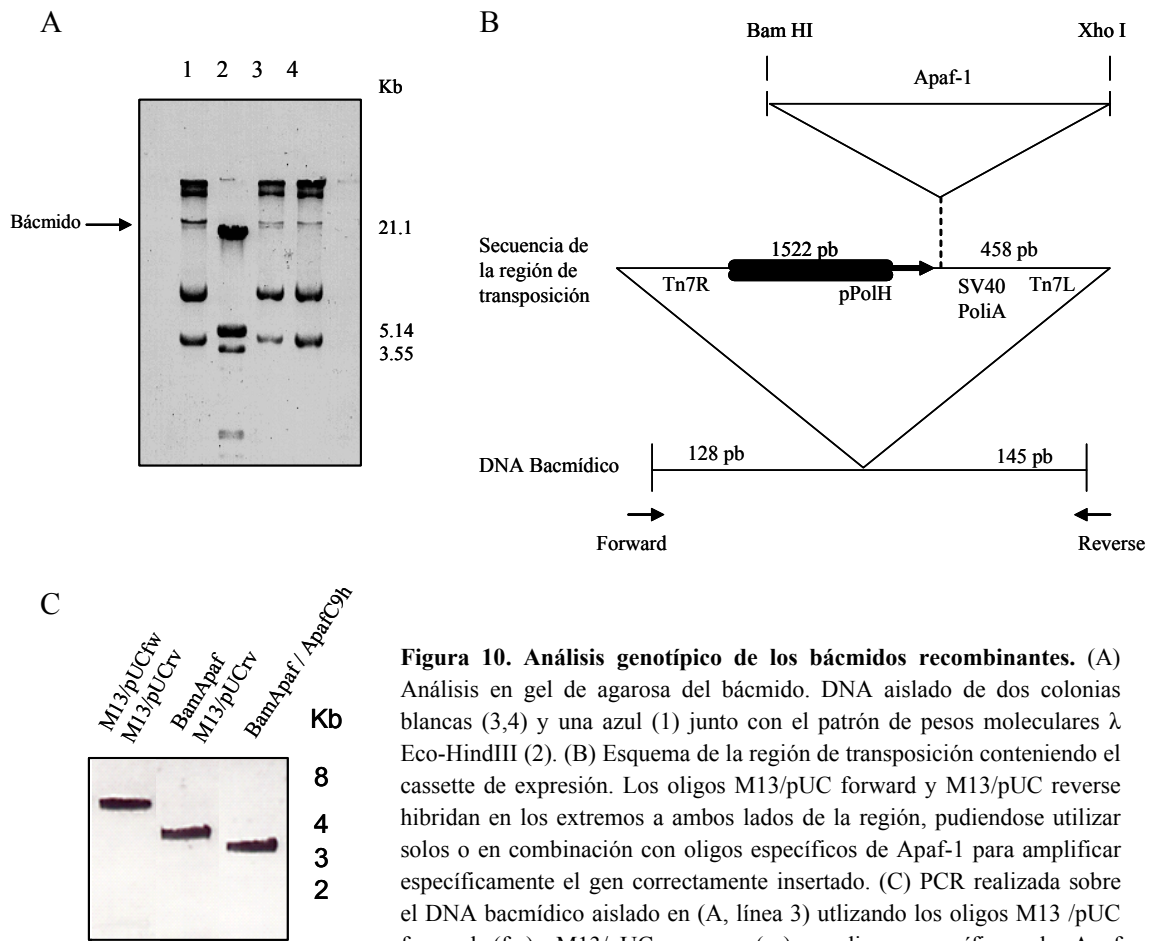


Figura 9. Esquema general de la construcción de baculovirus recombinantes y expresión génica de Apaf-1 con el sistema Bac-to-Bac.

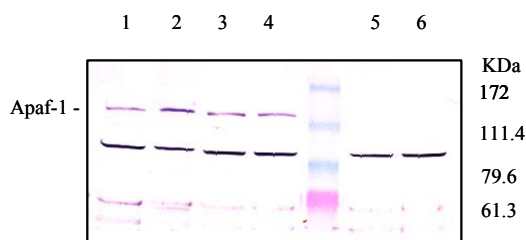


**Figura 10. Análisis genotípico de los báculos recombinantes.** (A) Análisis en gel de agarosa del báculo. DNA aislado de dos colonias blancas (3,4) y una azul (1) junto con el patrón de pesos moleculares  $\lambda$  Eco-HindIII (2). (B) Esquema de la región de transposición conteniendo el cassette de expresión. Los oligos M13/pUC forward y M13/pUC reverse hibridan en los extremos a ambos lados de la región, pudiéndose utilizar solos o en combinación con oligos específicos de Apaf-1 para amplificar específicamente el gen correctamente insertado. (C) PCR realizada sobre el DNA bacmídico aislado en (A, línea 3) utilizando los oligos M13 /pUC forward (fw), M13/pUC reverse (rv) y oligos específicos de Apaf (apartado 5.5.2.2.), según se indica.

El DNA plasmídico de alto peso molecular aislado de las células DH10 Bac se utilizó además para transfectar células SF9 de insecto utilizando un lípido catiónico. A los tres días de la transfección los cultivos infectados mostraban claros signos de citopaticidad en comparación con las células no transfectadas. Las células habían perdido la adherencia a la placa, su diámetro celular había aumentado y el núcleo se había engrosado visiblemente (Figura 14). Los sobrenadantes que contenían la primera generación viral recombinante ( $F_0$ ) se centrifugaron y alicuataron. Las células transfectadas se utilizaron para confirmar la expresión de Apaf-1

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

mediante *Western blot*. Como controles negativos se utilizaron lisados celulares procedentes de células no transfectadas y de células transfectadas con un báculo no recombinante aislado a partir de una colonia azul. Las células transfectadas o infectadas, sufren una alteración del patrón de expresión celular, una vez la maquinaria de síntesis proteica de la célula ha sido secuestrada por el virus, por lo que las células transfectadas con el virus “vacío” resultan útiles para comparar el perfil de proteínas de sus lisados celulares con el de células transfectadas con Apaf mediante *Western blot*.



**Figura 11. Análisis mediante *Western blot* de lisados totales de células SF9 recogidas a las 72 horas de la transfección. (1-4) Células transfectadas con baculovirus recombinantes de Apaf-1. (5) Células transfectadas con báculos aislados procedentes de una colonia azul. (6) Células no transfectadas.**

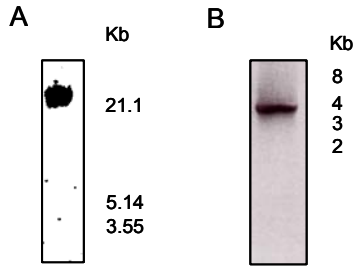
### 2.2.2. Generación de “stocks” virales

El volumen de  $F_0$  es pequeño, de aproximadamente 0,5 ml, por lo que ha de amplificarse hasta un volumen de “stock” viral que permita realizar series de infecciones a mayor escala. La amplificación se llevó a cabo mediante dos infecciones consecutivas de células SF9 sanas (Figura 12 C). Se utilizaron las alícuotas de  $F_0$  resultantes de la transfección para inocular placas de cultivo de células SF9 en monocapa (apartado 5.4.2.). Aproximadamente a las 72 horas de la infección, se obtuvo el sobrenadante de la segunda generación de virus ( $F_1$ ) en volumen de 10-12 ml. Finalmente, se utilizó una alícuota de  $F_1$  para amplificar el “stock” viral hasta un volumen de 300 ml. Este “stock”  $F_2$  constituyó el “stock” viral de trabajo y fue utilizado para realizar infecciones sobre cultivos líquidos de células de insecto que posteriormente se utilizaron para purificar Apaf-1. De manera habitual se siguió este esquema de producción de “stock”  $F_2$  para ser utilizado en la producción de Apaf-1, nunca llegando a producir una cuarta o quinta generación de virus ya que se observó disminución y en ocasiones pérdida de la expresión de Apaf-1 utilizando estos virus. Esto probablemente es debido a la acumulación de partículas víricas defectivas, capaces de infectar células ayudadas por otros virus, pero que



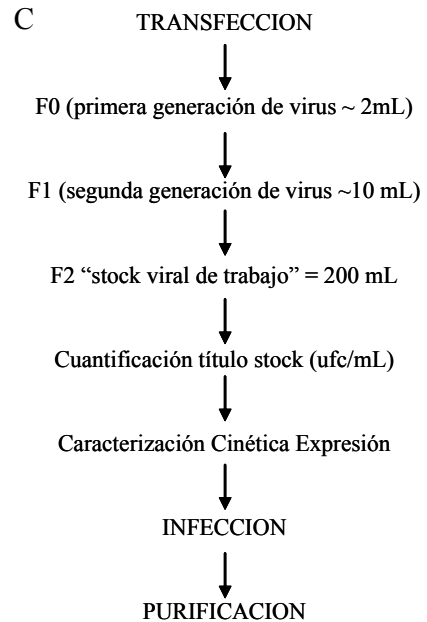
resultan ineficaces a la hora de expresar el gen heterólogo.

Para confirmar la presencia del gen completo de Apaf-1 y descartar posibles mutaciones en los virus responsables de la expresión, se llevó a cabo el análisis del DNA viral aislado del caldo de un cultivo infectado con F<sub>2</sub>. Utilizando como molde el DNA viral se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos que hibridan en los extremos del cDNA de Apaf-1 (apartado 5.5.2.2.). El gen Apaf-1 se amplificó con un tamaño esperado (3774 pb) y se secuenció parcialmente.



**Figura 12. Análisis del DNA viral y generación de stocks virales.** (A) DNA viral aislado a partir de un caldo de cultivo de células infectadas con F<sub>2</sub>. (B) PCR realizada utilizando como molde el DNA viral mostrado en el panel A y oligonucleótidos que hibridan en los extremos N y C-terminal de Apaf-1. (C) Esquema de generación de “stocks” virales.

Para realizar infecciones de células de insecto de manera controlada es necesario conocer el potencial infeccioso del “stock” viral. El parámetro “multiplicidad de la infección” (MDI) se define como el número promedio de unidades formadoras de placas (ufp) o virus que infectan una célula de insecto con éxito (ufp/cel). Así, si un cultivo es infectado con una multiplicidad de infección 3 quiere decir que cada célula recibe como promedio tres virus. Para analizar el título del “stock” de trabajo se realizó un ensayo en placa que consistió en inocular monocapas de células previamente sembradas en pocillos, con diluciones seriadas del stock. Se practicaron infecciones con las diluciones, dejándolas progresar alrededor de 45 horas y se cuantificaron los focos infecciosos mediante un inmunoensayo que detecta la proteína gp64 de la pared del virus. El inmunoensayo



## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

reveló núcleos de color azul en las monocapas ensayadas y su número se cuantificó utilizando el microscopio óptico (Figura 13). El título del “stock” se calculó mediante la cuantificación de los núcleos de infección y utilizando la fórmula (apartado 5.4.3.):

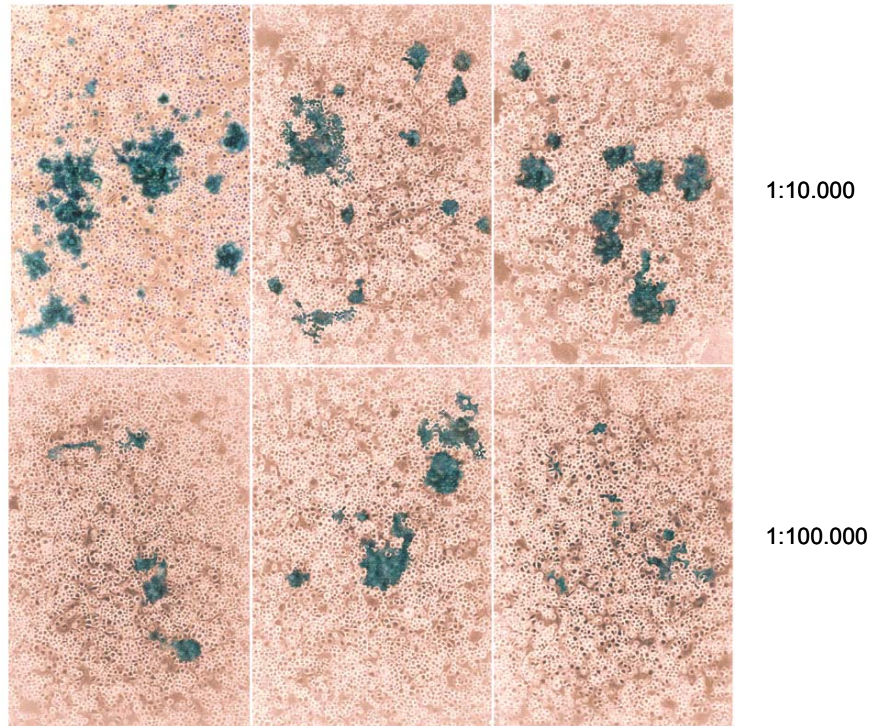
Título viral (ufp/mL) = n° promedio de focos por pocillo x factor de dilución x R

Una vez conocido el título del “stock”, el volumen de inóculo requerido para llevar a cabo una infección se calcula mediante la fórmula:

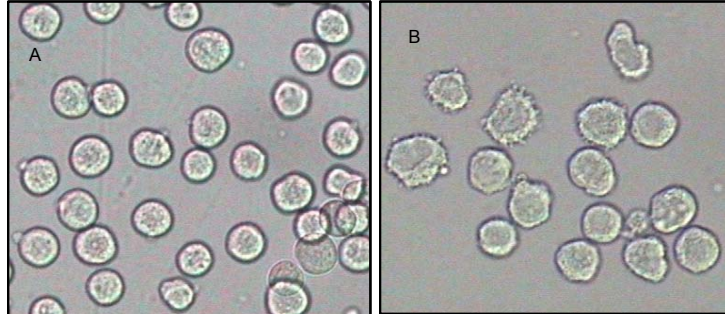
$$\text{Inóculo requerido (mL)} = \frac{\text{MDI deseada (ufp/cel)} \times (\text{número total de células})}{\text{Título del inóculo viral (ufp/ml)}}$$

### **2.2.3. Caracterización de la cinética de expresión de Apaf-1 y optimización de la expresión en cultivo líquido de células de insecto**

Los resultados obtenidos a la hora de expresar una proteína con el sistema de expresión en baculovirus y células de insecto dependen fuertemente de una serie de variables. Manteniendo constantes los factores ambientales (temperatura, medio de cultivo, ausencia de humedad), número de pases celulares y la viabilidad celular en sus niveles óptimos, los dos parámetros que determinaron tanto el rendimiento como la funcionalidad de Apaf-1 fueron el tiempo de infección y la MDI. Ambos parámetros se caracterizaron conjuntamente realizando series de infecciones de 50 mL de cultivo líquido de células SF9. Se infectaron los cultivos con distintos inóculos virales y se recogieron las células a distintos tiempos de expresión. Las células se lisaron y se separaron las fracciones soluble y membranosa mediante centrifugación. Las fracciones se analizaron mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo que reconoce Apaf-1 y se densitometraron las bandas para cuantificar la presencia de proteína. Alícuotas de las fracciones se analizaron utilizando el ensayo de activación de PC9 *in vitro* y se detectó actividad en algunas de ellas. Atendiendo a la funcionalidad de la proteína, en las condiciones de nuestro laboratorio, las MDI que resultaron mas adecuadas fueron 1-3 en combinación con tiempos de expresión de aproximadamente 40 horas (Figura 15). MDIs entre 5-10 dieron como resultado proteínas cuya actividad *in vitro* no fue la esperada, a pesar de representar una producción mayor de proteína.

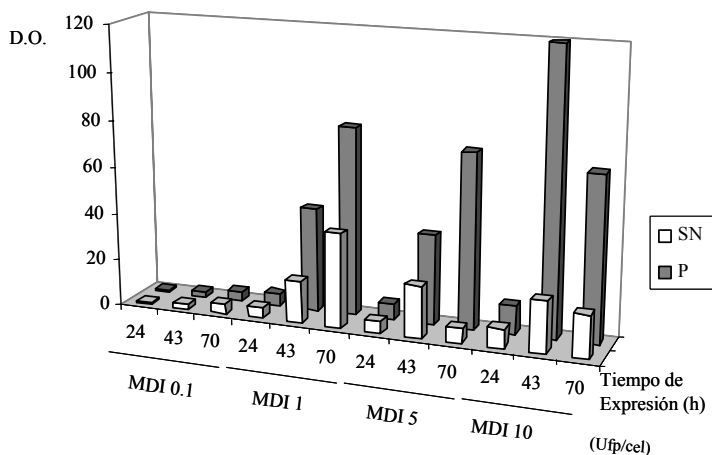


**Figura 13. Inmunolocalización de núcleos de infección baculovirales sobre un cultivo de células SF9 para la determinación del título de un “stock” viral.** Células fotografiadas con un microscopio invertido DIAPHOT-TMD, Nikon, con el objetivo de 20 aumentos. A la derecha de las micrografías se muestra el orden de dilución utilizado en el inmunoensayo.



**Figura 14. Células SF9 en cultivo creciendo en fase exponencial. (A) y a las 40 horas de la infección (B)** A medida que progresa la infección aparecen signos de citopaticidad como el engrosamiento del núcleo, aumento del diámetro celular, pérdida de viabilidad y en el caso de las células creciendo en monocapa, pérdida de adherencia. Las células fueron fotografiadas con un microscopio ECLIPSE E800, Nikon, con contraste de fases y objetivo de 40 aumentos.

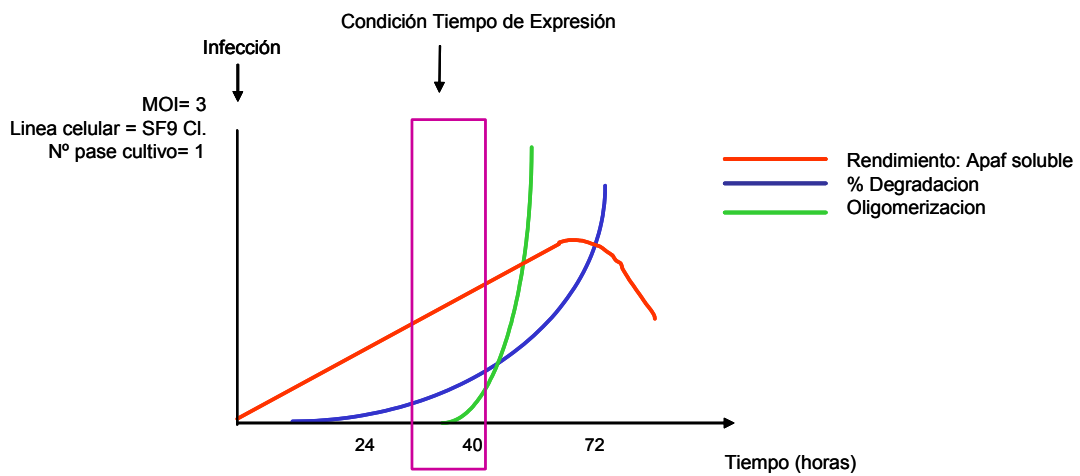
**Figura 15. Evolución de la expresión de Apaf-1 en cultivo de células de insecto en función del tiempo de expresión y la MDI.** Densitometrado de las bandas resultantes del análisis *Western blot* de las fracciones soluble y membranosa. SN: sobrenadante, P: pellet, D.O.: densidad óptica.



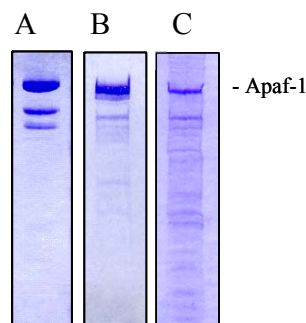
En líneas generales, fijando la MDI en un valor entre 1 y 3, el rendimiento total de proteína aumentaba linealmente con el tiempo. Durante las primeras fases de expresión la cantidad de proteína soluble aumentaba con el tiempo de expresión, pero a tiempos largos la proteína se expresaba muy abundantemente precipitando en cuerpos de inclusión (Figura 16). La degradación de la proteína y la pérdida de actividad también aumentaron proporcionalmente al tiempo de expresión (Figura 15).

En relación a la actividad de la proteína purificada, con células SF9, solo se obtuvo proteína activa, capaz de procesar PC9 de forma dependiente de Cit c a tiempos de expresión inferiores a 40 horas. La reconstitución de apoptosomas *in vitro* utilizando Apaf-1 expresado entre 40-50 horas no requería la adición de Cit c para procesar PC9. Además la proteína Apaf-1 expresada en estas condiciones era menos activa que la proteína obtenida a tiempos de infección menores de 40 horas. A igual cantidad de proteína ensayada la preparación de Apaf obtenida a tiempos inferiores era capaz de inducir el procesamiento del 100% de la PC9 añadida a la reacción, en contraste con lo que ocurría con la proteína obtenida a tiempos largos (Figura 16). Esto se correlacionó más tarde mediante filtración en gel y *Western blot* de las fracciones con oligomerización de Apaf-1 en el interior de las células de insecto y con pérdida de actividad de esos oligómeros. Por lo tanto para obtener Apaf-1 soluble, activa, dependiente de Cit c y en cantidades suficientes para realizar ensayos funcionales, se recogieron las células dentro de un intervalo tiempos de expresión óptimo y en combinación con MDIs de 1-3. El tiempo de infección óptimo y en general la dinámica de la infección y la expresión mostraron una fuerte

dependencia de la línea celular utilizada, incluso de la colección o lote de células particular dentro de una misma línea. La ventana de expresión a la que se colectaban las células para purificar Apaf-1, resultó ser de aproximadamente 36-40 horas para las células SF9-C, 21-24 horas para SF9-OB, 40-45 horas para SF21 de Invitrogen y 36-38 horas para SF9-HF. A tiempos más largos de los mencionados se obtenía Apaf-1 no dependiente de Cit c para activar PC9 y a tiempos de expresión superiores, se purificaba proteína inactiva. Multiplicidades de infección superiores a 5 mostraron un mayor rendimiento total de proteína, pero se observó una aceleración en los procesos de agregación y degradación, estrechándose o desapareciendo la ventana de expresión de obtención de Apaf-1 activo y monomérico.

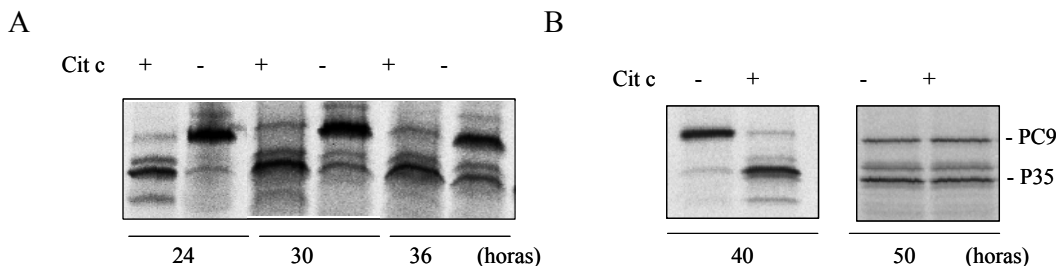


**Figura 16. Cinética de expresión de Apaf-1.** Relación entre el tiempo de expresión, el rendimiento, la degradación y la funcionalidad de Apaf-1 expresado en células SF9 (Clontech).



**Figura 17. Cinética de degradación de Apaf-1.** SDS-PAGE 10% de 1  $\mu$ g de Apaf-1 purificada en columnas de níquel agarosa y teñido con azul Coomassie. Apaf-1 expresada utilizando células SF9 (Clontech) y purificada a las 40 (A), 50 (B), 70 (C) horas desde la infección.

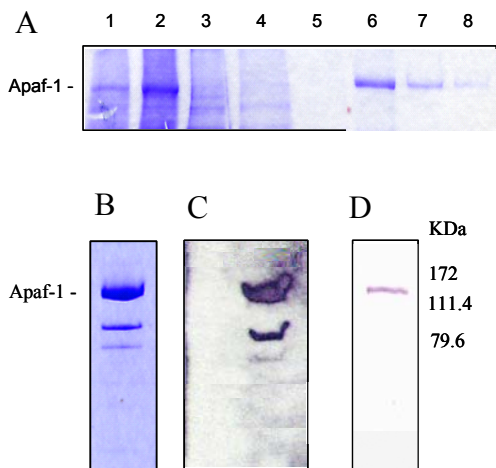
Reconstitución *in vitro* del apoptosoma



**Figura 18. Comparación del requerimiento de Cit c para procesar PC9 en el ensayo de reconstitución de apoptosomas utilizando Apaf-1 obtenido a distintos tiempos de infección.** (A) Células SF9-OB (B) Células SF9-C. Los tiempos óptimos de lisado de los cultivos fueron de 24 y 40 horas para las células analizadas en A y en B, respectivamente. Para los ensayos se utilizaron 200 ng de Apaf-1 purificado en columnas de níquel agarosa. MDI: 3.

**2.2.4. Purificación de Apaf-1**

Los lisados celulares se sometieron a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico en columnas de níquel agarosa según se explica en el apartado (5.6.1.2.). La identidad de la proteína se confirmó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial policlonal dirigido contra el fragmento N-terminal de Apaf-1. Igualmente se realizó *Western blot* con un anticuerpo policlonal dirigido contra el fragmento C-terminal de Apaf-1 (apartado 5.6.2.). Las dos bandas copurificadas Apaf-1 fueron reconocidas por este anticuerpo, lo que podría indicar que se tratase de dos fragmentos producidos en un primer estadio de degradación.

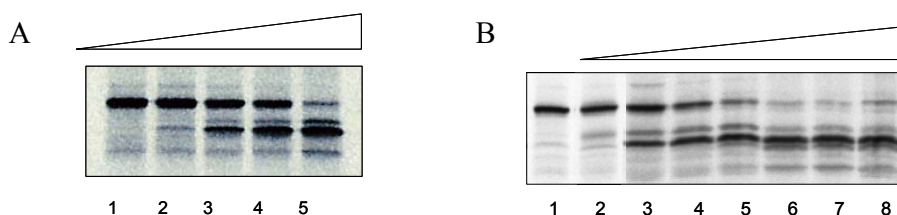


**Figura 19. Purificación de la proteína Apaf-1.** (A) (1-2) SDS-PAGE de un extracto citoplasmático de células de insecto infectadas. (1) Fracción soluble del lisado total, (2) fracción membranosa, (3-5) lavados, (6-8) tres volúmenes de eluido con imidazol 250 mM consecutivos y equivalentes al volumen de la columna. (B) SDS-PAGE 12% de 1 µg de Apaf-1 purificada en columnas de níquel agarosa y teñido con azul Coomassie. (C) *Western blot* de Apaf-1 purificada en níquel agarosa (línea derecha) y BSA (línea izquierda) utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio C-terminal de Apaf-1. (D) *Western blot* de Apaf-1 utilizando un anticuerpo dirigido contra el fragmento N-terminal de la proteína. La masa molecular de los patrones se muestra a la derecha del panel D.

### 2.3. Reconstitución de apoptosomas *in vitro*

El ensayo de reconstitución de apoptosomas se basa en la incubación de los componentes fundamentales del apoptosoma expresados *in vitro* y purificados para inducir la oligomerización de Apaf-1 y posterior procesamiento y activación de PC9. La incubación de Apaf-1 recombinante, Cit c y ATP, ó dATP, junto con PC9, tiene como resultado el corte proteolítico de PC9 para dar lugar a las subunidades correspondientes a su doble heterodímero activo. El procesamiento de PC9 se monitoriza mediante marcaje radiactivo de PC9, resolución de las muestras en SDS-PAGE y autorradiografía.

Para reconstituir apoptosomas *in vitro*, se reajustaron las condiciones del ensayo descritas en la literatura para adaptarlas a nuestras condiciones de laboratorio. Se hicieron titulaciones con la proteína Apaf-1 para establecer la cantidad mínima de proteína capaz de procesar el 100% de la caspasa disponible en una hora. En nuestras condiciones de laboratorio la cantidad de Apaf-1 requerida para reproducir el ensayo fue de 100-200 ng, con pequeñas variaciones dependiendo de la preparación de proteína (Figura 20).



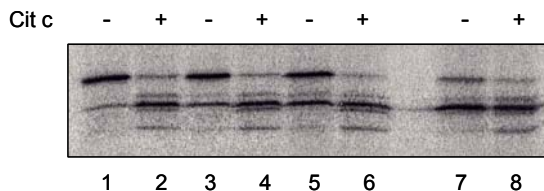
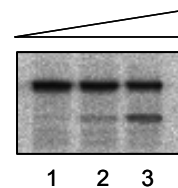
**Figura 20. Titulación de la cantidad de Apaf-1 y Cit c necesaria para activar PC9 en el ensayo.** (A) Variación de la concentración de Apaf-1 en el ensayo de activación de PC9. Las reacciones 1-5 contienen: 0, 30, 50, 100 y 200 ng de Apaf-1. Las concentraciones de Cit c (30 ng) y PC9 (3µl) en las reacciones se mantuvieron constantes. (B) Variación de la concentración de Cit c en las reacciones de activación de PC9 conteniendo 200 ng de Apaf-1 y 3 µL PC9. La reacción 1 no contiene Cit c y las reacciones 2-8 contienen: 2, 5, 10, 20, 30, 60, 300 ng de Cit c. El volumen final de las reacciones fue de 20 µL.

La cantidad mínima de Cit c necesaria para inducir la oligomerización de Apaf-1 en estas condiciones fueron 30 ng. Excesos de Cit c no tenían efecto en el resultado final observado (Figura 20). Sin embargo, se observó que Apaf-1 activaba PC9 en ausencia de Cit c cuando

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

Apaf-1 se encontraba a altas concentraciones, por lo que posiblemente estuviese oligomerizando (Figura 21). En algunos casos, debido a las limitaciones de sensibilidad del método de cuantificación de proteínas utilizado, hubo que titular la preparación de Apaf-1 purificada ensayando diluciones seriadas y ajustando los volúmenes de trabajo dentro un segundo intervalo de dependencia de Cit c. La posibilidad de oligomerización de Apaf-1 en ausencia de Cit c no está descrita en la literatura, pudiendo tratarse de un fenómeno limitado a la proteína recombinante o tal vez se podría pensar en la existencia de niveles de regulación transcripcionales que indujesen una oligomerización de Apaf-1 independiente de Cit c. Contrariamente, las preparaciones de Apaf-1 obtenidas a tiempos de expresión superiores a los caracterizados para el intervalo de expresión óptimo, no presentaban dependencia de Cit c a ninguna concentración ensayada. En términos poblacionales se trataba de preparaciones de proteína con una alta proporción de moléculas de Apaf-1 independientes de Cit c para procesar caspasa y globalmente menos activos. La hipótesis de que se tratara de oligómeros de alto peso molecular se confirmó mediante experimentos de filtración en gel como se explica en el apartado 2.4.

**Figura 21. Titulación de Apaf-1 en ausencia de Cit c.** Las reacciones se llevaron a cabo de forma estandar y se añadieron cantidades crecientes de Apaf-1 a las reacciones: (1) 200 ng, (2) 400 ng, (3) 800 ng.

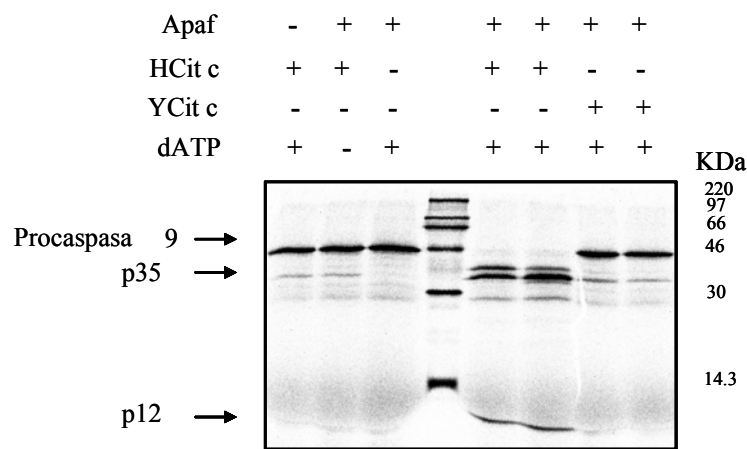


**Figura 22. Titulación de una preparación de Apaf-1.** Reacciones de activación del procesamiento de PC9 *in vitro* utilizando diluciones seriadas de un "batch" de Apaf-1: (1-2) 50 ng Apaf-1, (3-4) 100 ng, 5-6: 200 ng, (7-8) 400 ng.

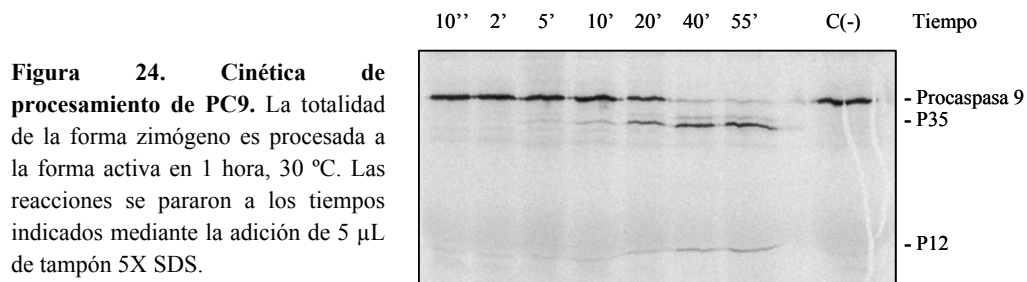
Las condiciones definidas como óptimas se pusieron en práctica para reconstituir la actividad del apoptosoma *in vitro* incubando Apaf-1, Cit c, PC9 transcrita y traducida *in vitro* y marcada radiactivamente, en tampón A (Hepes-KOH 20 mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, DTT 0,1 mM, PMSF 0,1 mM) suplementado con dATP 0,1 mM (apartado 5.7.1.). La ausencia de



cualquiera de los componentes del apoptosoma en la reacción (Apaf-1, Cit c, ó ATP) resultó en la conservación de PC9 en su versión zimógeno (apartado 1.2.). Únicamente cuando todos los componentes del apoptosoma estaban presentes se observó autoprosesamiento mediante corte proteolítico de las formas de PC9 para dar lugar al doble heterodímero activo con las subunidades mayor (p35) y menor (p12). Como control negativo se utilizó Cit c de levadura, ya que no es capaz de activar el apoptosoma en este sistema (Kluck *et al.*, 1997). El 100% de PC9 se procesó en una hora a 30 °C (Figuras 23, 24). Alternativamente, también se puede monitorizar el procesamiento del sustrato natural de PC9 activa, procaspasa 3 (PC3), cuando se añade a las reacciones transcrita y traducida *in vitro* y marcada radiactivamente. PC9 se añadía a estas reacciones expresada de la misma manera pero sin marcaje radiactivo.

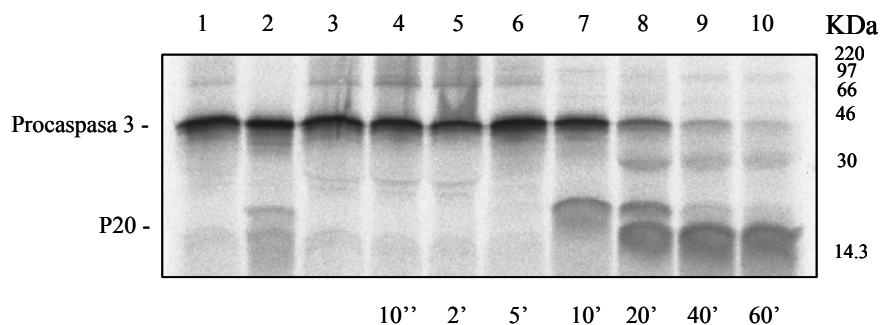


**Figura 23. Ensayo de activación de PC9.** 200 ng Apaf-1, 30 ng Cit c, 3  $\mu$ L PC9 transcrita y traducida *in vitro* y marcada radiactivamente, se incubaron durante 1h a 30 °C en tampón A suplementado con 0,1 mM dATP, 1 mM  $MgCl_2$ . El volumen total de las reacciones fue de 20  $\mu$ L. Tras la incubación las muestras se sometieron a SDS-PAGE 16% y se visualizaron mediante autorradiografía. H Cit c: Cit c de corazón de caballo. Y Cit c: Cit c de levadura



**Figura 24. Cinética de procesamiento de PC9.** La totalidad de la forma zimógeno es procesada a la forma activa en 1 hora, 30 °C. Las reacciones se pararon a los tiempos indicados mediante la adición de 5  $\mu$ L de tampón 5X SDS.

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

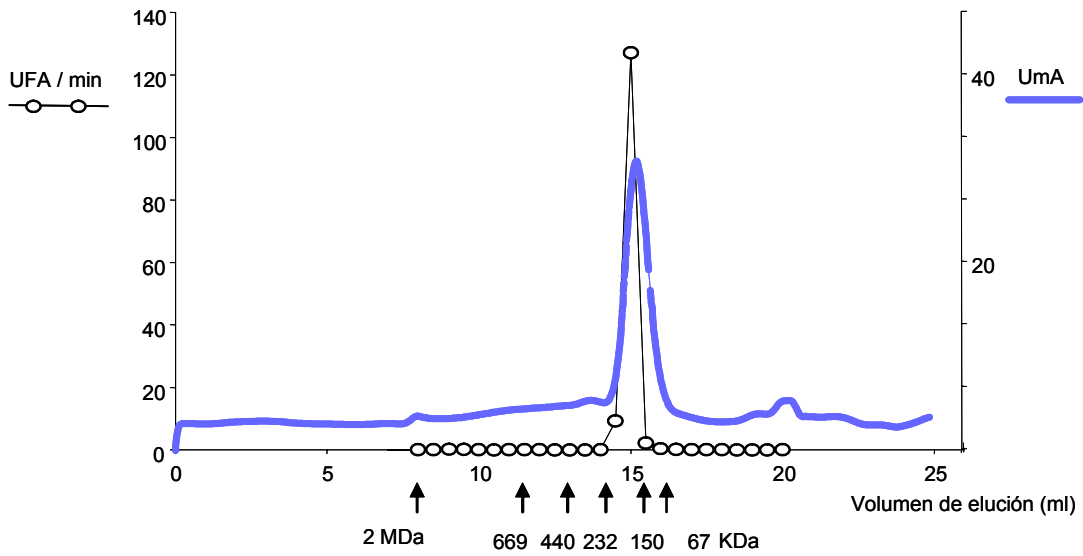


**Figura 25. Cinética de procesamiento de PC3.** (1-3) Controles negativos en ausencia de Apaf-1 (1), Cit c (2), PC9 (3). (4-10) Reacciones conteniendo Apaf-1, Cit c, PC9, PC3 y dATP se dejaron progresar los tiempos indicados. La totalidad de PC3 se consumió en 1h para dar lugar a su forma activa.

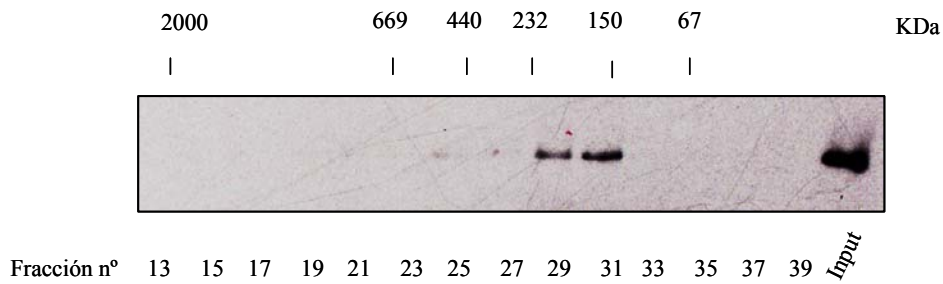
### 2.4. Análisis de Apaf 1 por FPLC y caracterización de su actividad en extractos celulares de mamífero

Tras el paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas de níquel agarosa, Apaf-1 fue sometido a un segundo paso de purificación por cromatografía de filtración en gel. La columna empleada en la filtración en gel resultó útil para resolver las formas monomérica y oligomérica de Apaf-1. La cromatografía se llevó a cabo según se explica en el apartado 5.6.1.2., tras lo cual se procedió al análisis de las fracciones mediante dos tipos de análisis. En primer lugar se realizó *Western blot* de las fracciones para detectar la presencia de Apaf-1. En segundo lugar, se combinaron pequeñas alícuotas de las fracciones obtenidas con extractos de células de mamífero 293 deficientes en Apaf-1: FT (Fearnhead *et al.*, 1997). Para comprobar el potencial activador de caspasas de cada fracción se analizó la hidrólisis del sustrato fluorogénico de caspasa 3: Ac-DEVD-Afc. Como se explica en el apartado 5.7.2., el extracto FT, obtenido por fragmentación del extracto total, no contiene Apaf-1, de manera que la actividad de la proteína recombinante es capaz de complementar esta actividad y es posible observar activación de PC3. Como se observa en la Figura 26, tras la cromatografía, el perfil de elución de Apaf-1, mostró coincidencia entre los picos de actividad, absorbancia y la presencia de Apaf-1 por *Western blot*, pudiéndose confirmar la calidad del estado monomérico de Apaf-1 antes de ser sometido a tratamiento de oligomerización por

A



B



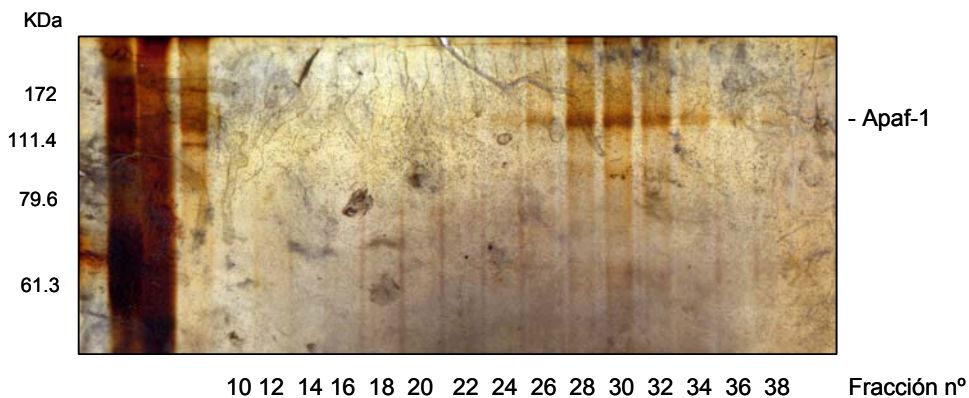
**Figura 26. Purificación de Apaf-1 mediante filtración en gel.** (A) La proteína, previamente purificada mediante cromatografía de intercambio iónico, se inyectó en una columna Superosa 6. Se combinaron 4  $\mu$ L de las fracciones con 5  $\mu$ L de FT y 1  $\mu$ L de ATP 10 mM. Las reacciones se incubaron 30 min a 37 °C tras lo cual se midió el consumo de Ac-DEVD-Afc por minuto. Apaf-1 fue expresado en células SF9-HF, a una densidad de  $1.10^6$  cels/mL durante 40 horas y a una MDI de 3. UFA/min: unidades de fluorescencia arbitrarias, UmA: unidades de miliabsorbancia. (B) *Western blot* de las fracciones impares obtenidas mediante filtración en gel utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-Apaf-1 (Alexis 18H2). Se indica la masa molecular de los patrones.

## Reconstitución *in vitro* del apoptosoma

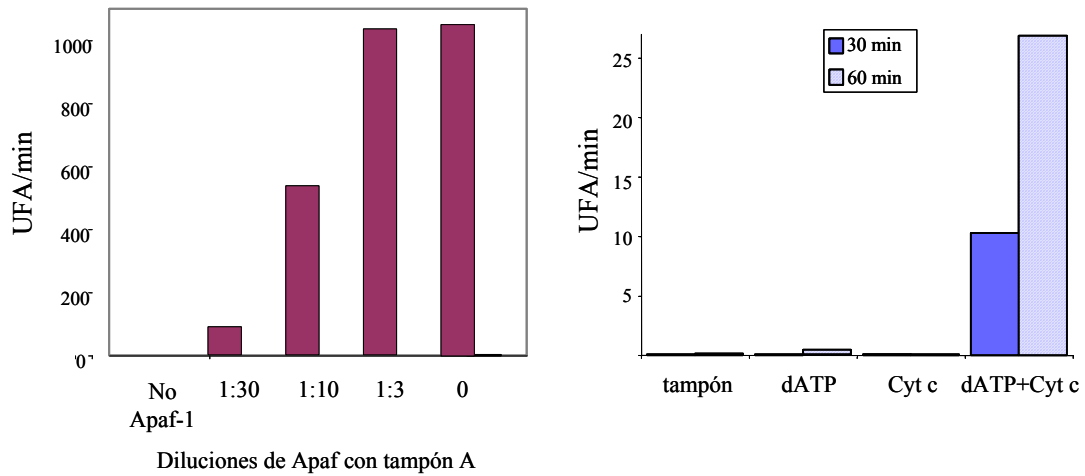
adición de Cit c externo en forma recombinante o presente en extractos. La proteína eluyó a un volumen de elución correspondiente a un peso molecular igual al esperado de ~140 kDa. En la Figura 27 se muestra el resultado del análisis de las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE y tinción con plata.

En un experimento paralelo, en el que se utilizó Apaf-1 purificado a partir de células infectadas durante más de 40 horas, se encontró una población molecular heterogénea, donde la mayoría de la proteína correspondía a fracciones de alto peso molecular. El pico de actividad caspasa existente en esa mezcla antes de ser fraccionada correspondía a la fracción monomérica que representaba una pequeña proporción de la proteína total, de manera que a medida que la preparación de proteína formaba agregados de alto peso molecular, perdía actividad global.

La cantidad mínima de Apaf-1 recombinante necesaria para activar un extracto se determinó mediante titulación por ensayo de diluciones seriadas de proteína (Figura 28, A). La funcionalidad de la proteína se comprobó además ensayando su capacidad de activación de caspasas utilizando extractos deficientes en Apaf-1 y Cit c. Los extractos FT-S derivan de extractos FT y contienen caspasas 9 y 3, pero se ha eliminado Cit c mediante cromatografía de intercambio iónico (apartado 5.7.2.1.). Se confirmó de nuevo el requerimiento de adición externa de Cit c y ATP para activar extractos FT-S vaciados de Cit c combinados con Apaf-1.



**Figura 27. SDS-PAGE 8 % de las fracciones obtenidas mediante filtración en gel.** Las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Las tres primeras carreras de la izquierda corresponden al lisado total eluido en el volumen vacío. A la izquierda se muestra la masa molecular de los patrones.



**Figura 28. Caracterización de la actividad de Apaf-1 recombinante en extractos.** (A) Titulación de la cantidad mínima necesaria para activar extractos FT. Se realizaron diluciones seriadas de una disolución de Apaf -1 recombinante (200 ng/ $\mu$ L) y se ensayaron en combinación con 5  $\mu$ L de extracto FT y 1 mM ATP. (B) Ensayo de Apaf-1 recombinante con extractos FT-S deficientes en Cit c. Se combinó Apaf-1 con 5  $\mu$ L de extracto FT-S, 1 mM ATP y 1  $\mu$ M Cit c según se indica. Apaf-1 fue purificado mediante columnas de intercambio iónico (níquel-agarosa) y de filtración en gel.



### **3. Identificación de Moduladores del Apoptosoma**

---

Con el objetivo de identificar compuestos dirigidos a modular la activación de caspasas dependiente del apoptosoma, en el presente capítulo se analiza una doble estrategia; por un lado el uso de la química combinatoria y por otro, el diseño racional de estructuras peptídicas basadas en datos recientes respecto a la naturaleza de la interacción Cit c-Apaf-1. El ensayo de activación de caspasas puesto a punto en el apartado anterior, hizo posible tanto el análisis de la fuente de diversidad química disponible en nuestro laboratorio, como el estudio posterior del mecanismo molecular de la inhibición (capítulo 4).

#### **3.1. Química Combinatoria**

La utilización de quimiotecas combinatorias sintéticas ha supuesto la aplicación de una nueva y revolucionaria tecnología en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Constantemente, en especial desde la secuenciación del genoma humano y el progreso de la proteómica, se están definiendo y validando nuevas dianas terapéuticas, con lo que la aceleración de los procesos de generación de nuevos compuestos e identificación de moléculas bioactivas es de gran interés.

La química combinatoria posibilita la síntesis simultánea de un elevado número de moléculas que forman colecciones de compuestos (quimiotecas), tanto de péptidos como de moléculas orgánicas no peptídicas, consiguiendo una gran diversidad química.

La química combinatoria comenzó con la síntesis y utilización de quimiotecas peptídicas iterativas en las que se intercalaban los procesos de síntesis en fase sólida y ensayo biológico (Houghten *et al.*, 1991). Posteriormente la técnica se extendió con el uso de las quimiotecas en formato de rastreo posicional en las que, en cada mezcla, solo una de las posiciones del polímero está definida mientras que el resto se mantiene variable. En este caso, tras el ensayo de las mezclas o cribado, se determina la importancia de cada residuo en una posición particular, se sintetizan los compuestos definidos particulares y se demuestra su actividad biológica. En la

actualidad se han sintetizado mediante esta técnica muchas clases de quimiotecas, que incluyen quimiotecas de péptidos, peptidomiméticos y heterociclos..

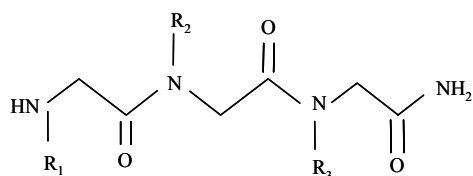
### 3.2. Quimioteca de pseudopéptidos

Los pseudopéptidos o peptoides son una familia de oligómeros, no naturales, originalmente diseñados para su uso en programas de identificación de candidatos a fármacos mediante química combinatoria (Simon *et al.*, 1992, Montoliu *et al.*, 2002, García-Martínez *et al.*, 2002). Entre las diferentes moléculas que pueden ser definidas como peptoides, cabe destacar los polímeros de N-alquilglicinas sustituidas. Estas moléculas representan algunas ventajas frente a los péptidos, ya que poseen mejores propiedades farmacocinéticas, son más resistentes a proteasas, presentan una mejor absorción y al presentar la cadena lateral en el nitrógeno y no en el carbono  $\alpha$ , presentan mayor flexibilidad conformacional (Miller *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1999).

La quimioteca de pseudopéptidos fue sintetizada en formato de rastreo posicional utilizando metodología en fase sólida en el laboratorio del Profesor Àngel Messeguer (Departament de Química Orgànica Biològica, IIQAB-CSIC, Barcelona) (Humet *et al.*, 2003). Los pseudopéptidos definidos derivados de su deconvolución, así como los distintos análogos bioactivos, fueron sintetizados por la Dra. Isabel Massip (miembro del mismo laboratorio). El esqueleto pseudopeptídico de los trímeros de alquilglicinas que componen la quimioteca se muestra en la Figura 29.  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  representan las aminas utilizadas como fuente de diversidad química. Inicialmente, en la síntesis de la quimioteca se utilizaron 20 aminas comerciales, quedando representados una amplia variedad de grupos químicos en ellas (Figura 30). Posteriormente se redujo la diversidad de la quimioteca original (Massip *et al.*, resultados pendientes de publicación) para generar una nueva versión de la quimioteca menos redundante químicamente. La quimioteca consiste en 52 mezclas controladas y se organiza en tres subquimiotecas atendiendo a la posición que está definida en el trímero. Así, las mezclas 1 a 20 ( $O_1XX$ ) contienen como posiciones definidas una de las 20 aminas seleccionadas comercialmente disponibles en la primera posición, mientras que las posiciones X (posiciones variables) contienen un grupo de 16 aminas primarias. Las mezclas 21 a 36 ( $XO_2X$ ) y 37 a 52



(XXO<sub>3</sub>) contienen una posición definida correspondiente a una de las 16 aminas del grupo seleccionado (reducido). El total de compuestos en la quimioteca es de 5.120 (20 x 16 x 16). Las mezclas definidas que conforman cada subquimioteca se ensayaron como inhibidores del procesamiento de PC9 *in vitro*.



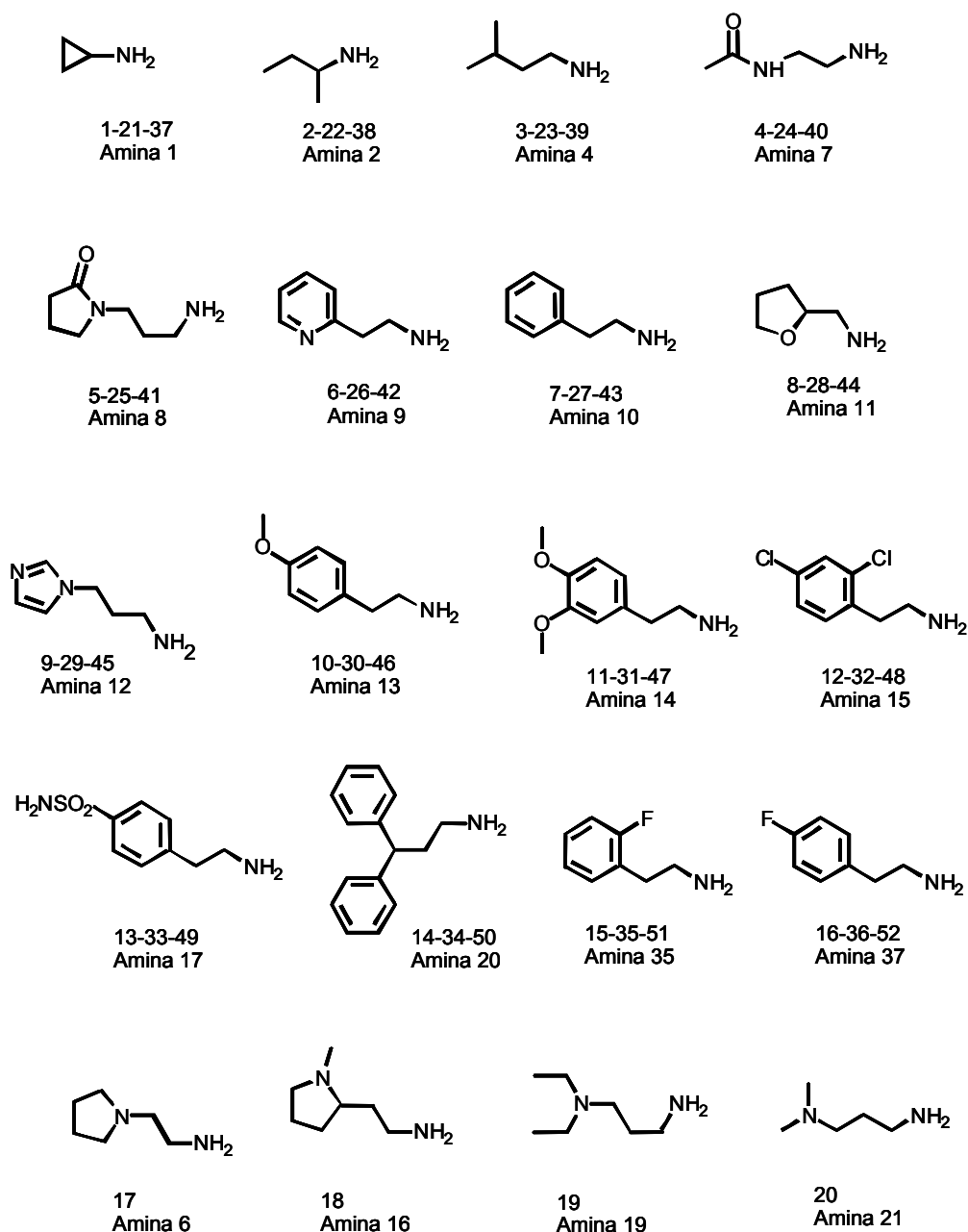
OXX-NH<sub>2</sub>: aminas 1- 20  
 XOX-NH<sub>2</sub>: aminas 21- 36  
 XXO-NH<sub>2</sub>: aminas 37- 52

**Figura 29. Estructura química de los pseudopéptidos de la quimioteca.** R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan las cadenas laterales de cualquiera de las aminas utilizadas en la síntesis. X: posición combinatorializada, O: posición definida.

### 3.3. Cribado de la quimioteca de pseudopéptidos

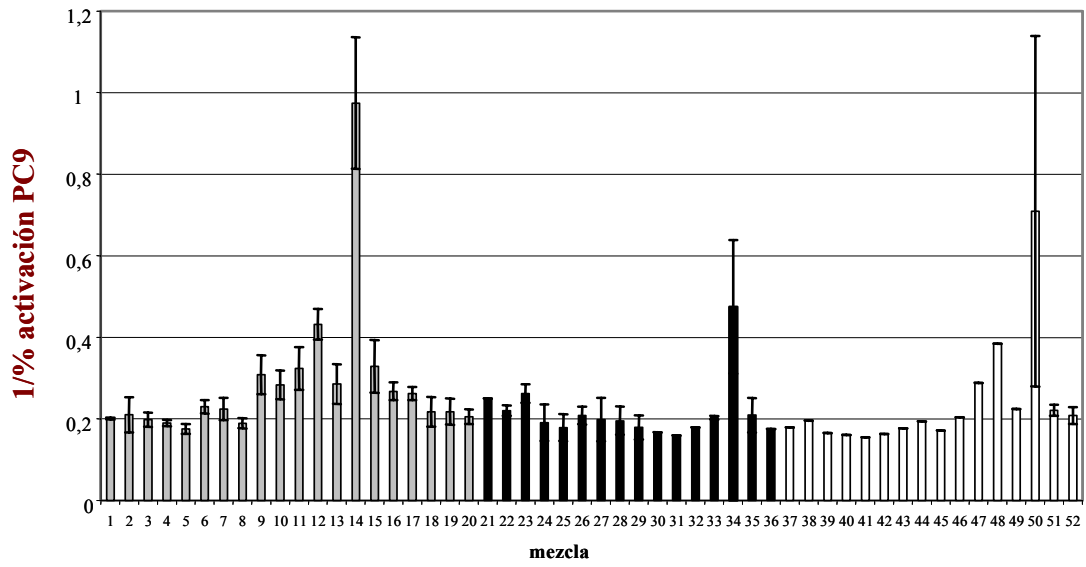
La quimioteca se ensayó con el objetivo de encontrar moléculas que inhibiesen el procesamiento de PC9 *in vitro* utilizando el ensayo de reconstitución de apoptosomas y se cuantificó el porcentaje de activación de PC9 como se explica en el apartado 5.11. Inicialmente, las 52 mezclas que constituyen la quimioteca se ensayaron a una concentración final de 0,8 mM. Utilizando esta concentración se observó una inhibición generalizada en un gran número de mezclas, por lo que hubo que reducir la concentración de las mezclas en el ensayo a 0,4 mM. La quimioteca se ensayó paralelamente y por duplicado con dos preparaciones de Apaf-1, expresadas y purificadas en distintas condiciones, una de los cuales mostraba requerimiento de Cit c para activar PC9 y la segunda activaba PC9 independiente de Cit c exógeno, por lo que no se adicionó Cit c en el ensayo en este caso (apartado 2.2.3.). Los resultados que se obtuvieron se representan en la Figura 31.

## Identificación de moduladores del apoptosis

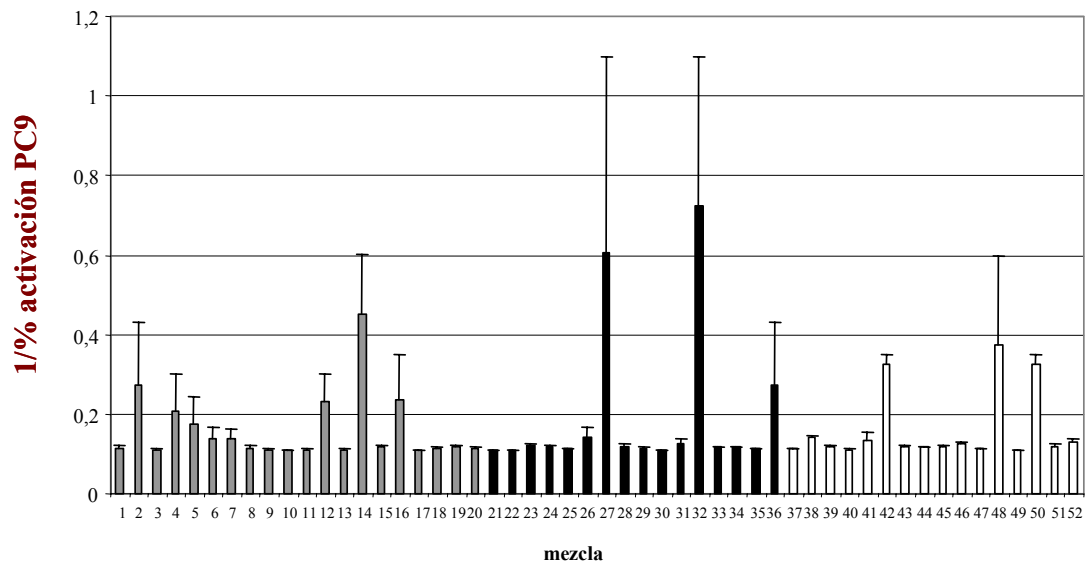


**Figura 30. Representación y numeración de las aminas que componen las cadenas laterales de los pseudopéptidos.** Se indica la posición que ocupan en el trímero cada una de las 20 aminas que componen las mezclas. Las aminas 6, 16, 19, y 21 se encontrarían únicamente en la primera posición de las mezclas 17, 18, 19, y 20.

A

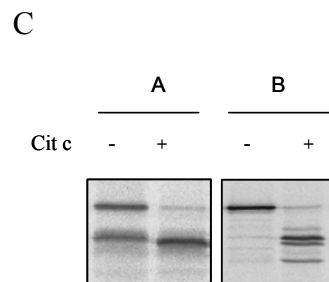


B



## Identificación de moduladores del apoptosma

**Figura 31. Cribado de las mezclas controladas que componen la quimioteca de pseudopéptidos.** La concentración final de las mismas en el ensayo fue de 0,4 mM. Se representa el inverso del porcentaje de procesamiento de PC9 de cada una de las mezclas. Las barras grises representan los valores para las mezclas en que la amina está definida en la primera posición (1-20), las barras negras indican los valores relativos a las aminas de la segunda posición definida (21-36) y las blancas para la tercera (37-52). (A) cribado realizado utilizando una preparación de Apaf-1 no dependiente de Cit c para activar PC9. Para el cribado mostrado en (B) se utilizó una preparación de Apaf-1 que requería Cit c para la activación. (C) Actividad de las preparaciones de Apaf-1 utilizadas en los cribados de la quimioteca. En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C en tampón A.



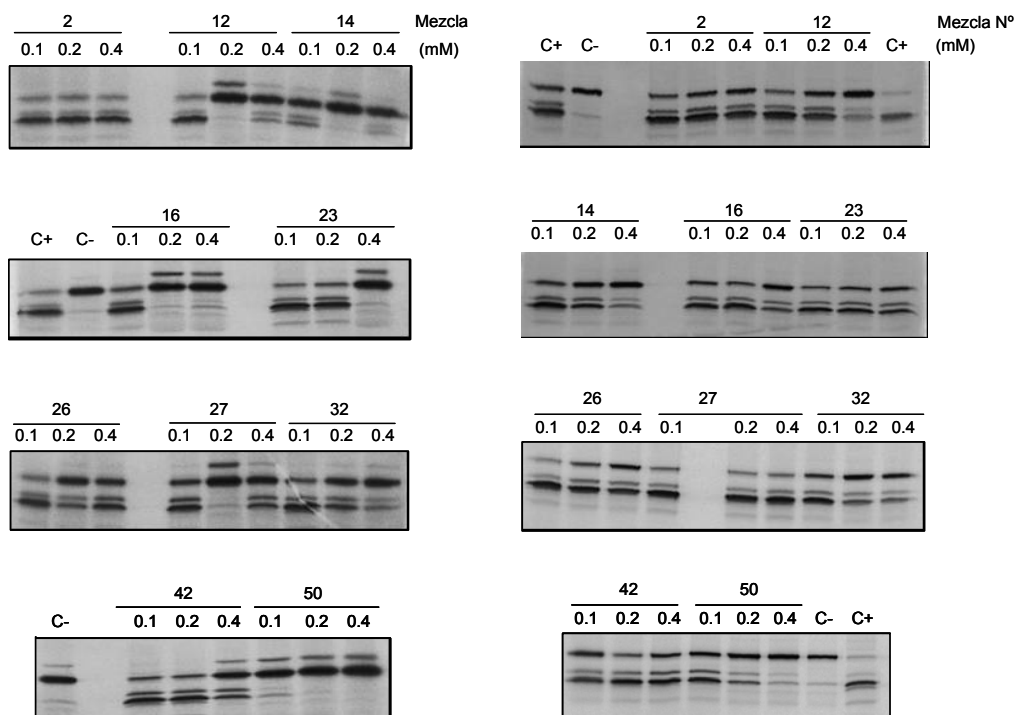
### 3.4. Dosis dependencia de las mezclas

Con el objetivo de confirmar los resultados de la deconvolución y seleccionar las aminas más activas en cada posición, se estudió el grado de inhibición a distintas concentraciones de la mezcla en el ensayo. Se seleccionaron aquellas mezclas que en los dos cribados de la quimioteca presentaron mayor actividad inhibidora en los ensayos. Estas mezclas fueron: 2, 12, 14, 16, 23, 34, 26, 27, 32, 48, 42 y 50. Se siguió el mismo esquema de reacción descrito anteriormente, con adición de Cit c exógeno y se analizó un intervalo de concentraciones en el ensayo entre 0,1 y 0,4 mM. Los resultados obtenidos con el ensayo de activación de PC9 *in vitro*, por duplicado, se muestran en la Figura 32 y en la Tabla 2.

Se consideró como valor de  $IC_{50}$  aquella concentración de compuesto que producía un 50% de inhibición del procesamiento de PC9.

**Tabla 2. Valores de  $IC_{50}$  de las mezclas de pseudopéptidos.**

Mezcla	2	12	14	16	23	26	27	32	34	42	48	50
$IC_{50}$ (mM)	>0.4	>0.2	> 0.1	> 0.2	>0.4	> 0.4	> 0.1	> 0.2	> 0.4	> 0.4	>0.2	> 0.1



**Figura 32. SDS-PAGE y autorradiografía de reacciones de inhibición con algunas de las mezclas seleccionadas.** La actividad inhibidora del procesamiento de PC9 de las mezclas se ensayó a una concentración final entre 0,1 y 0,4 mM.

### 3.5. Pseudopéptidos definidos

Para realizar la selección de las aminas que tenían que formar parte de los compuestos activos definidos, se atendió además de al criterio de actividad, al de la especificidad por lo que se eligieron las aminas que, en cada una de las tres posiciones del esqueleto pseudopeptídico presentaran una mayor actividad y selectividad frente a su diana. Estas aminas fueron: 2,4-Diclorofenilamina (A15, mezcla 12) y 3,3-Difenilpropilamina para la primera posición (A20, mezcla 14). 3,3-Difenilpropilamina para la segunda posición (A20, mezcla 34). 2,4-Diclorofenilamina (A15, mezcla 48) y 3,3-Difenilpropilamina para la tercera posición (A20,

## Identificación de moduladores del apoptosma

mecla 50). Las aminas A9 y A37, aunque menos activas que las aminas A15 y A20, también mostraron cierta actividad inhibitora, por lo que además se sintetizaron pseudopéptidos que contenían las aminas A15 y/o A20 en combinación con las aminas A9 y A37: 2-(2-Piridil)etilamina (A9), y 4-fluorofenetilamina (A37). De la combinación de estas aminas entre sí se sintetizó una familia de 7 pseudopéptidos de secuencia definida con las aminas en cada una de las tres posiciones del trímero, seleccionadas con el ensayo biológico. Las estructuras de los pseudopéptidos definidos se muestran en la Figura 33.

Con el ensayo de activación de PC9 y manteniendo las condiciones del ensayo inicial, se ensayaron los siete pseudopéptidos definidos. No se observó actividad inhibitora de los pseudopéptidos N-37-15-20-C, N-15-9-20-C y N-15-9-15-C a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  o menor. Los cuatro pseudopéptidos N-20-20-20-C, N-15-20-20-C, N-20-20-15-C, N-15-20-15-C inhibían el procesamiento de PC9 de forma dosis dependiente a una concentración en el ensayo entre 20  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  (Figura 34). A concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$  (200  $\mu\text{M}$ ) la inhibición dejaba de observarse en el caso de algunos pseudopéptidos, posiblemente debido a la formación de agregados. A modo de control negativo también se ensayaron otros pseudopéptidos definidos disponibles en nuestro laboratorio, tales como el N-11-13-15-C, los cuales no mostraron actividad inhibitora a las concentraciones ensayadas (Figura 34).

**Tabla 3. Valores de las  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los pseudopéptidos de secuencia definida que se identificaron en el cribado de la quimioteca.**

Pseudopéptido	N-15-20-15-C	N-15-20-20-C	N-20-20-15-C	N-20-20-20-C	N-37-15-20-C	N-15-9-20-C	N-15-9-15-C
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	< 20 $\mu\text{M}$	< 20 $\mu\text{M}$	< 20 $\mu\text{M}$	< 20 $\mu\text{M}$	> 50 $\mu\text{M}$	> 50 $\mu\text{M}$	> 50 $\mu\text{M}$

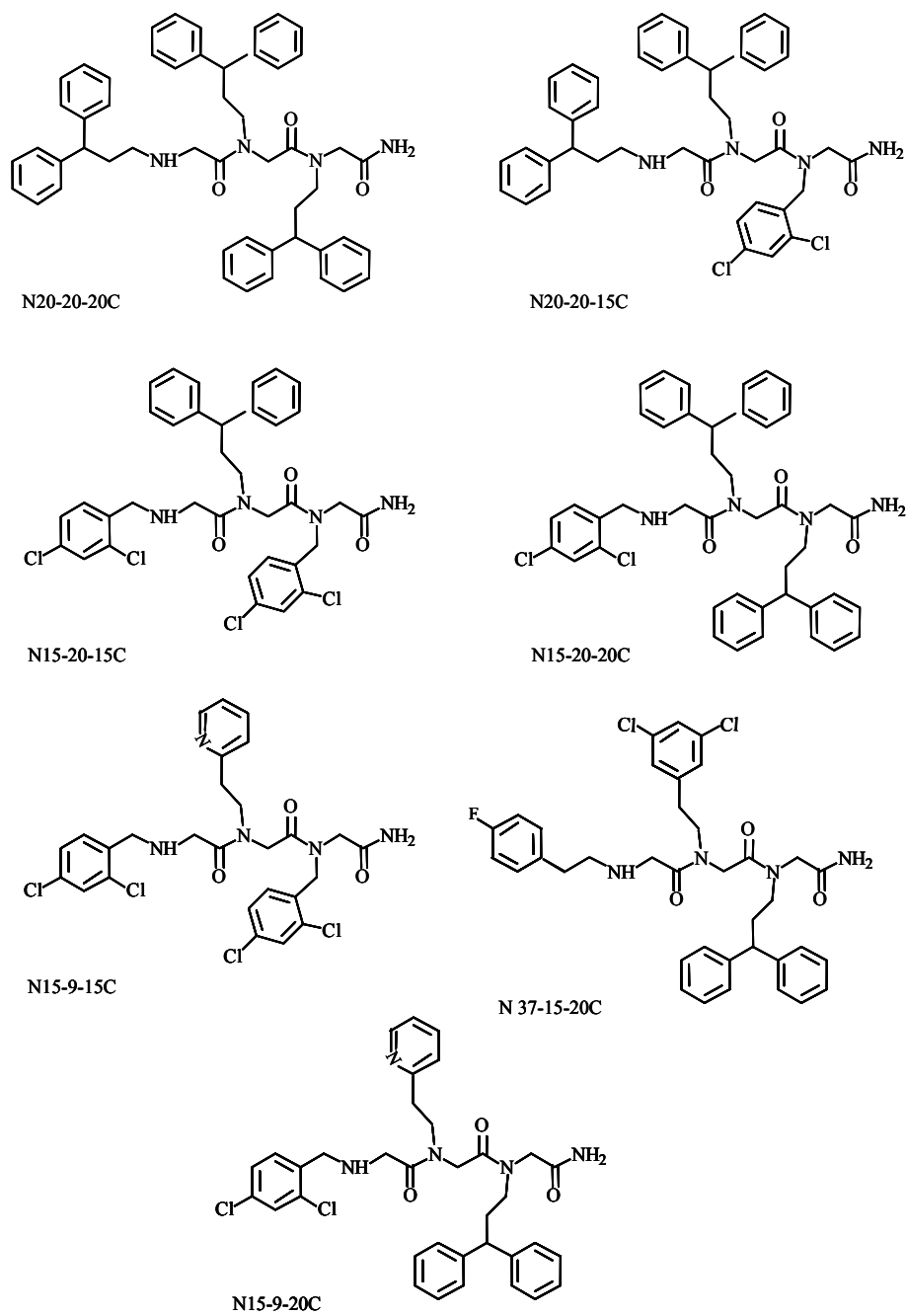
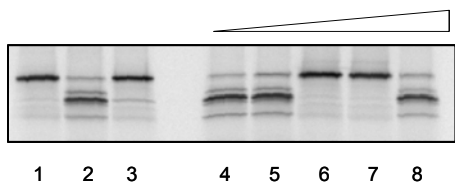
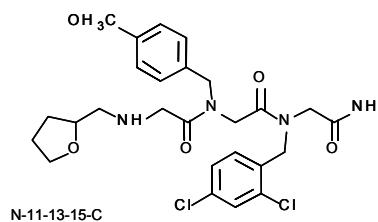
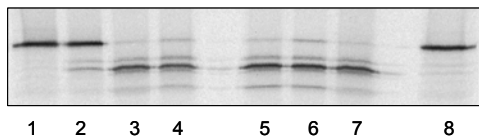


Figura 33. Representación de la estructura química de los 7 pseudopéptidos que se definen a partir de la deconvolución de la quimioteca.



**Figura 34. Titulación de la actividad del pseudopéptido N-20-20-15-C utilizando el ensayo de activación de PC9.** (1) Control negativo de actividad en ausencia de Apaf-1. (2) Control positivo de actividad en presencia de Apaf-1 y Cit c. (3) Control negativo en ausencia de Cit c. (4-8) Pseudopéptido ensayado a distintas concentraciones (0,6, 6, 20, 40, 200  $\mu$ M) en tampón A, 30  $^{\circ}$ C.



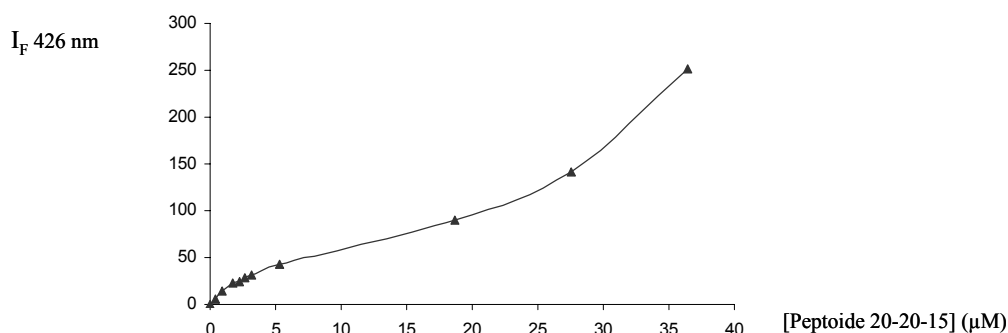
**Figura 35. Test de especificidad. Ensayos de inhibición del pseudopéptido N-11-13-15-C.** (1) Control negativo en ausencia de Apaf-1. (2) Control negativo en ausencia de Cit c. (3) Control positivo en presencia de Apaf-1 y Cit c. (4) Control positivo con 6.8% DMSO (igual a la concentración de DMSO máxima utilizada en reacción 7). (5-7) Reacciones en las que Apaf-1 se preincuba con distintas cantidades de pseudopéptido N-11-13-15-C (20, 40, 70  $\mu$ M). (8) Pseudopéptido N-20-20-20-C ensayado a 20  $\mu$ M. Las reacciones se llevaron a 30  $^{\circ}$ C en tampón A.

Durante los ensayos de caracterización de los pseudopéptidos definidos se encontró falta de reproducibilidad entre las distintas alícuotas de un mismo pseudopéptido ensayadas y problemas a la hora de disolver algunas preparaciones. En concreto, se observaron variaciones en la cantidad de DMSO requerida para reproducir su actividad y en ocasiones ausencia la actividad inhibidora. Estas observaciones junto con la pérdida de actividad a alta concentración y teniendo en cuenta la alta hidrofobicidad intrínseca de los compuestos seleccionados, condujeron a pensar en la posibilidad de que los compuestos tuviesen tendencia a la autoagregación.



### 3.6. Estudio de la agregación de los peptoides mediante espectroscopia de fluorescencia

El análisis de la posible autoagregación de los peptoides en disolución acuosa se llevó a cabo mediante espectroscopia de fluorescencia. Se utilizó la sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), que en medios polares, en disolución acuosa, presenta un rendimiento cuántico muy bajo y por tanto poca emisión de fluorescencia. En cambio, en medios hidrofóbicos cuando el fluoróforo no es accesible al agua, el rendimiento cuántico aumenta y con él la emisión fluorescente a 430 nm cuando se excita a 380 nm (Zhang *et al.*, 1996). Disoluciones 5  $\mu\text{M}$  de DPH se titularon con concentraciones crecientes de pseudopéptido en tampón MOPS-NaOH 5 mM pH 7,0 con el objetivo de analizar la formación de complejos formados por moléculas de peptoide y calcular su concentración micelar crítica o CMC (apartado 5.10). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 36. Se observó un incremento en la emisión fluorescente, indicando la incorporación de la sonda al interior hidrofóbico de complejos formados por los pseudopéptidos. Estos resultados aunque no permitieron definir una CMC, sugieren que la pérdida de inhibición de los pseudopéptidos a concentraciones de 200  $\mu\text{M}$  podría correlacionar con una posible formación de agregados macromoleculares a altas concentraciones.



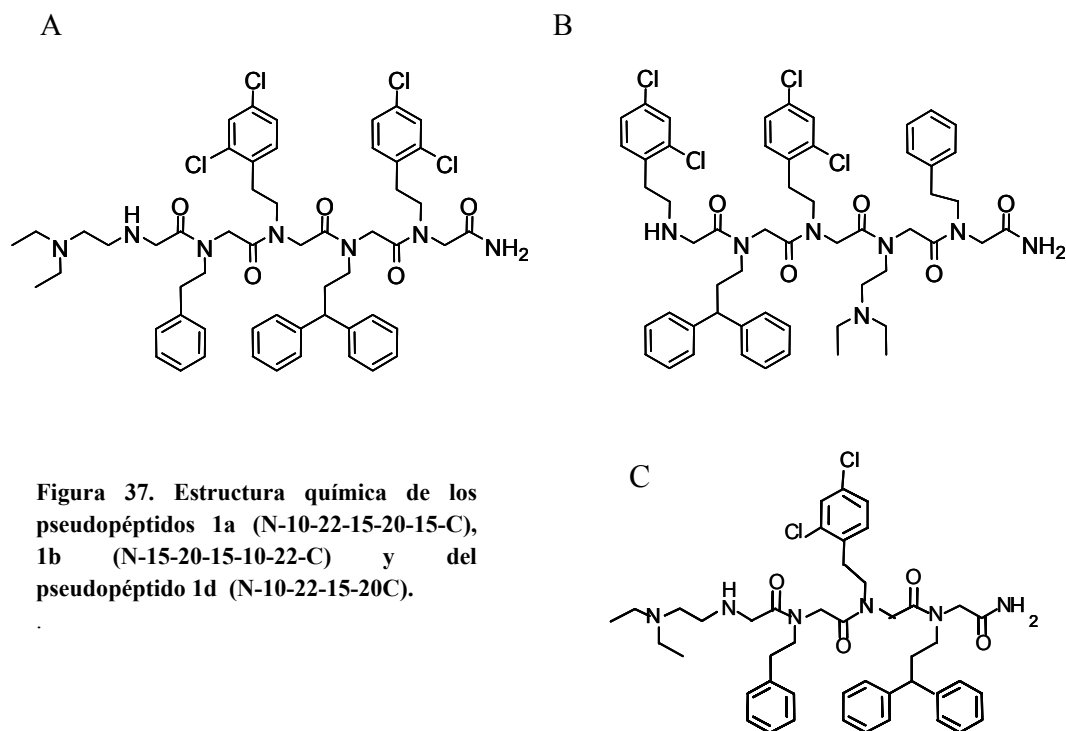
**Figura 36. Análisis mediante espectroscopia de fluorescencia de la formación de complejos de pseudopéptido 20-20-15.** Intensidad de la emisión de la fluorescencia de la sonda DPH (5  $\mu\text{M}$ ) a 426 nm tras ser excitada a 380 nm en presencia de distintas concentraciones de pseudopéptido.

### 3.7. Síntesis de análogos del pseudopéptido N-15-20-15-C

Para evitar las dificultades mencionadas en apartados previos y hacer compatible el estudio de los compuestos con los ensayos *in vitro* e *in vivo* (los cuales presentan restricciones respecto a las concentraciones de DMSO admitidas), resultó necesario mejorar las propiedades de solubilidad de los compuestos. Por otro lado, debido a la naturaleza hidrofóbica del pseudopéptido, se podían anticipar problemas de permeabilización de membrana en ensayos celulares, por lo que este hecho, unido a la necesidad de mejora en la solubilidad de los compuestos hizo que se pensase en la síntesis de análogos de los pseudopéptidos originales, en concreto del pseudopéptido N-15-20-15-C, con el que se habían obtenido mejores resultados.

Experiencia previa de nuestro laboratorio en el diseño de péptidos bioactivos (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2000, Pastor *et al.*, 2002) indicaba que la presencia de cadenas laterales con carga positiva con una glicina espaciadora en el extremo N-terminal o C-terminal de un péptido incrementaba la solubilidad general del compuesto sin afectar a la conformación estructural o las propiedades biológicas. Además, la utilización de unidades benzil más una amina cargada unidos a un hexapéptido bioactivo había incrementado tanto las propiedades de solubilidad como las propiedades de permeabilización de membrana (Pérez-Payá *et al.*, 2003). Con estos antecedentes se sintetizaron los peptoides 1a y 1b, los cuales presentaban dos residuos adicionales de N-alkilglicina; uno con carga positiva a pH fisiológico y otro consistente en un residuo de benceno (Figura 37, A, B). Los residuos adicionales de los pseudopéptidos 1a y 1b, se encontraban situados en el extremo C-terminal o N-terminal del trímero original respectivamente, con el objetivo de estudiar si la posición de los residuos afectaba a la actividad del compuesto.

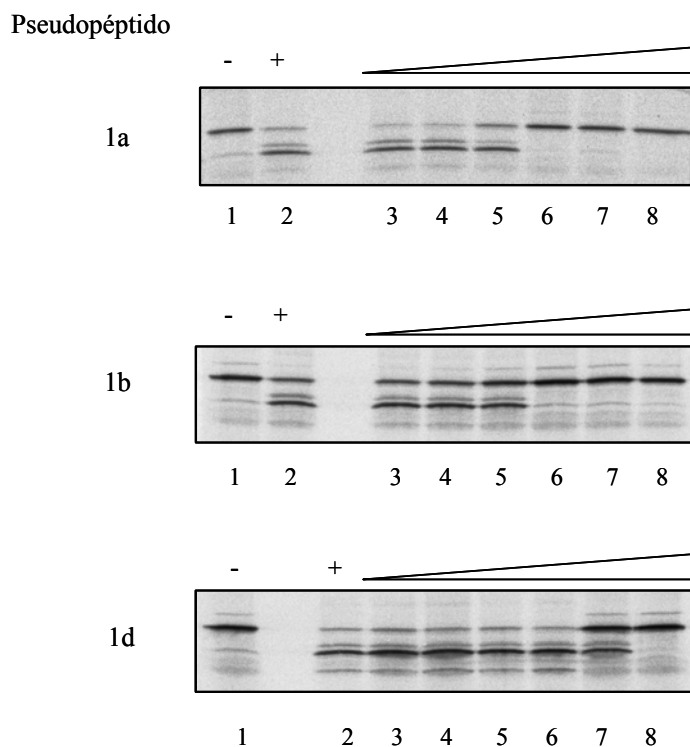
El tetrapeptido 1d se sintetizó con el objetivo de analizar si la eliminación de un residuo de diclorofeniletilamina en el pseudopéptido 1a daba como resultado un pseudopéptido menos activo para la inhibición del procesamiento de PC9 (Figura 37, C).



### 3.8. Determinación de la IC<sub>50</sub>

Los análogos de los pseudopéptidos originales sintetizados, 1a, 1b y 1d, presentaron una actividad dependiente de la dosis ensayada. En general no se observaron diferencias o falta de reproducibilidad entre distintas preparaciones, comprobándose una mayor solubilidad de los compuestos. Para determinar la concentración de molécula inhibidora que produce un 50% de la inhibición de la actividad enzimática en estudio, se procedió al ensayo de los compuestos utilizando diluciones seriadas del inhibidor a una concentración final en el ensayo entre 2 y 100  $\mu\text{M}$ . Se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> en torno a 20  $\mu\text{M}$  tanto para el peptoide 1a como para el peptoide 1b. Estos resultados indicaron que la posición de los dos residuos adicionales de alquilglicina (en N-terminal o C-terminal) no afecta a la actividad inhibidora del peptoide. Sin embargo se observó una disminución de la actividad inhibidora en el caso del peptoide 1d, poniendo de manifiesto que el segundo grupo de diclorofenetilamina es importante para la actividad.

## Identificación de moduladores del apoptosma



**Figura 38. Titulación de la actividad de los pseudopéptidos 1a, 1b y 1d utilizando el ensayo de activación de PC9 *in vitro*.** Los pseudopéptidos y Apaf-1 se incubaron a 30 °C, 30 min, a continuación se adicionaron PC9 y Cit c y se dejaron progresar las reacciones 1 hora. Las concentraciones utilizadas de pseudopéptidos 1a, 1b y 1d en el ensayo fueron: 2, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ M (3-8). (1) Control negativo en ausencia de Cit c. (2) Control positivo. Ambos controles se preincubaron 30 °C, 30 min en tampón A.

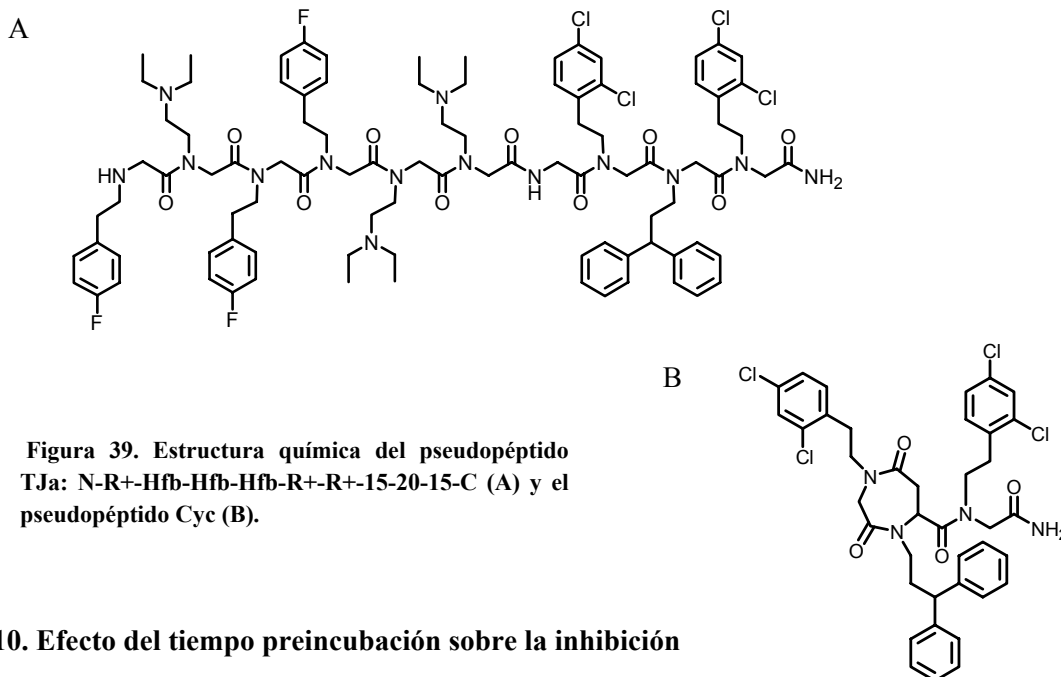
### 3.9. Pseudopéptidos análogos para utilización en estudios *in vivo* TJa, TAT, PEN y Cyc.

El acceso de moléculas exógenas al interior celular depende fuertemente de sus propiedades de solubilidad. La molécula debe ser suficientemente polar para poder disolverse en los fluidos biológicos, pero relativamente apolar para poder atravesar la membrana plasmática con eficiencia. Se ha demostrado que determinados dominios proteicos de pequeño tamaño son capaces de atravesar las membranas biológicas de manera eficiente e independiente de proteínas transportadoras o receptores específicos, y que pueden transportar péptidos y proteínas que se

encuentren unidos covalentemente al interior de las células (Joliot *et al.*, 2004, Morris *et al.*, 2001). Entre los dominios más utilizados para transportar péptidos a través de la membrana plasmática se encuentran la proteína TAT (RKKRRQRRR) del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 (Frankel *et al.*, 1988, Green *et al.*, 1988), la tercera hélice  $\alpha$  del homeodominio de Antennapedia o sus derivados como penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK) (Joliot *et al.*, 1991) y la proteína V22 del virus herpes simplex (Elliott *et al.*, 1997). Además de péptidos naturales, se han diseñado una amplia variedad de secuencias transportadoras artificiales basadas en los residuos de lisina y arginina de la secuencia del péptido TAT (Wender *et al.*, 2000, Futaki *et al.*, 2001, Umezawa *et al.*, 2002, Peretto *et al.*, 2003, Mitchell *et al.*, 2003). En concreto se han encontrado homologías estructurales entre el dominio TAT y homopolímeros de aminoácidos básicos como poliarginina o polilisina, entre otros, que además han resultado ser útiles en el transporte de moléculas a través de la membrana plasmática. Por otro lado, el diseño de análogos pseudopeptídicos de los homopolímeros peptídicos se ha desarrollado con éxito. Los peptoides transportadores conservan el espaciamiento 1,4 del esqueleto de oligoglicina, contienen cadenas laterales similares a arginina en el nitrógeno amida y resultan especialmente resistentes a proteasas (Pardridge *et al.*, 2002).

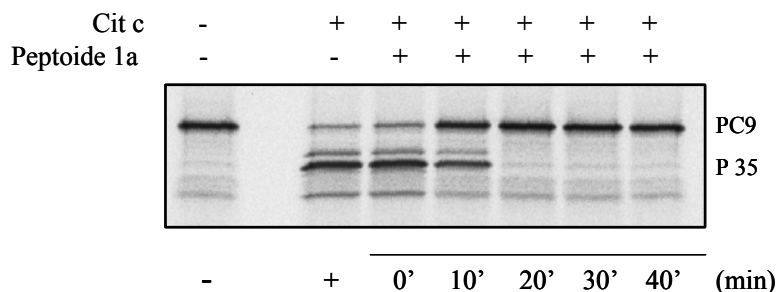
Para disminuir la capacidad de autoagregación y por tanto pérdida de actividad del compuesto y además aumentar las propiedades de permeabilidad de membrana de los pseudopéptidos 1a y 1b, se diseñó el pseudopéptido TJa (Figura 39). Se fusionó la estructura de N-15-20-15-C a pseudopéptidos policatiónicos (análogos de péptidos polibásicos). Su estructura aporta un segmento consistente en una serie de residuos de aminas con carga positiva y residuos hidrofóbicos. La función de estos residuos es la de servir como elemento que permita la internalización de la molécula en las células y además, al tratarse de un grupo de naturaleza pseudopeptídica, reducir la sensibilidad a proteasas respecto a los carriers peptídicos. Asimismo se sintetizaron análogos del peptoide 1a fusionados a las secuencias de trasducción al interior celular, penetratina y TAT, cuya capacidad de internalizar péptidos en células es conocida. También se sintetizó una versión del peptoide 1a ciclado, el cual presenta mayor rigidez conformacional. Este grupo de compuestos se sintetizaron con el objetivo de estudiar su potencial como agente protector de la apoptosis en estudios *in vivo* y se estudiarán en apartados posteriores (apartado 4.10.).

## Identificación de moduladores del apoptosis



### 3.10. Efecto del tiempo preincubación sobre la inhibición

Se observó que para que la inhibición tuviese lugar, era necesario realizar una preincubación previa de Apaf-1 con los pseudopéptidos en tampón A de alrededor de 10 min a la temperatura del ensayo (figura 40). Este hecho se interpretó como un indicio de posible interacción física entre Apaf-1 y los pseudopéptidos.

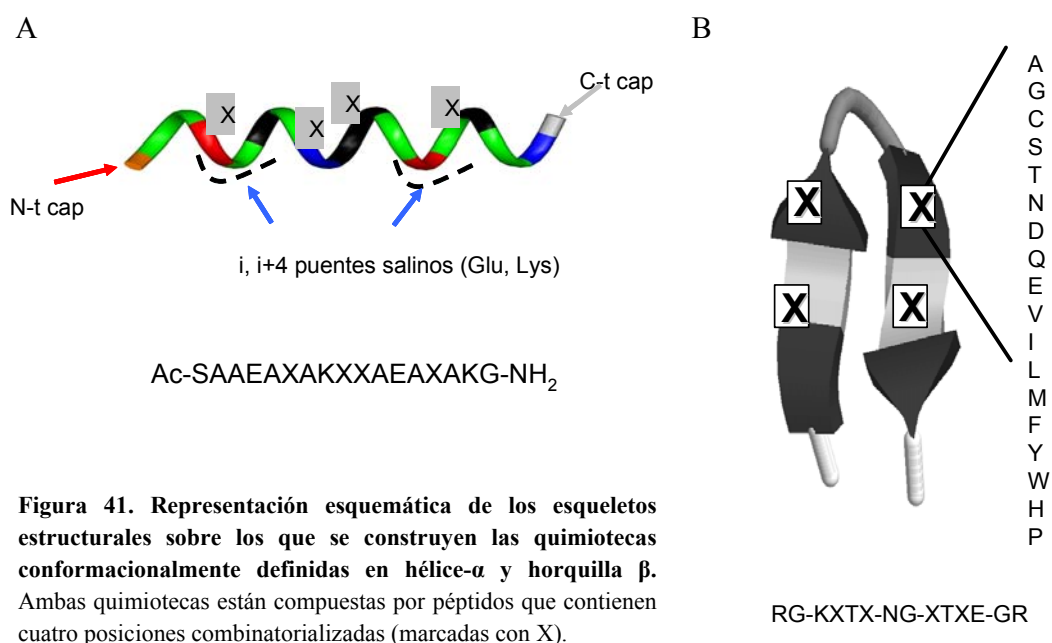


**Figura 40. Efecto del tiempo de preincubación de Apaf-1 con el pseudopéptido 1a sobre la inhibición del procesamiento de PC9.** Apaf-1 fue preincubado con el peptide 1a 50  $\mu$ M a 30  $^{\circ}$ C durante los tiempos indicados, en un volumen de 16  $\mu$ L, tras lo cual se añadieron Cit c y PC9 hasta completar 20  $\mu$ L. Las reacciones se dejaron progresar a 30  $^{\circ}$ C durante 1 hora. Los controles (-, +) se preincubaron 30  $^{\circ}$ C, 30 min en ausencia de pseudopéptido. No se adicionó Cit c al control negativo.

Hasta el momento, se podía pensar en cualquiera de las proteínas presentes en el ensayo como diana de los pseudopéptidos; Apaf-1, las caspasas e incluso, no se podía descartar que la inhibición tuviese lugar afectando a la actividad del apoptosoma de manera indirecta a través de alguna de las proteínas del lisado de reticulocitos presentes en la alícuota de PC9 y no eliminadas tras su síntesis.

### 3.11. Otros cribados

Además de la quimioteca de pseudopéptidos se cribaron dos quimiotecas de naturaleza peptídica, diseñadas y sintetizadas en nuestro laboratorio. Se trata de quimiotecas conformacionalmente definidas (QCD) en hélice- $\alpha$  (Blanes-Mira *et al.*, 2003) y horquilla  $\beta$  (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2000, Pastor *et al.*, 2002,) que se caracterizan por estar construidas sobre un esqueleto o andamio estructural, el cual presenta un alto porcentaje de población de moléculas estructuradas. La caracterización estructural de las quimiotecas QCD se ha llevado a cabo mediante técnicas de dicroísmo circular.



**Figura 41. Representación esquemática de los esqueletos estructurales sobre los que se construyen las quimiotecas conformacionalmente definidas en hélice- $\alpha$  y horquilla  $\beta$ .** Ambas quimiotecas están compuestas por péptidos que contienen cuatro posiciones combinatorializadas (marcadas con X).

## Identificación de moduladores del apoptosoma

La estructura del apoptosoma se ha resuelto a nivel de 27Å por crio-microscopía electrónica (Acehan *et al.*, 2002). Mediante esta técnica y estudios de modelización molecular se ha propuesto un modelo estructural del apoptosoma en 3D en el que siete moléculas de Apaf y de Cit c se organizan en una estructura en forma de rueda de siete ejes. Cit c (estructura  $\alpha$ -helicoidal) se situaría rodeado por los dominios WD40 (motivos con estructura en hoja  $\beta$ ) de Apaf-1 interaccionando a través de una superficie extensa. Las quimiotecas QCD han sido utilizadas previamente en la modulación de procesos de reconocimiento molecular que implicaban la interacción de superficies entre proteínas (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2000, Mas *et al.*, 2002, Blanes-Mira *et al.*, 2003).

La quimioteca conformacionalmente definida en horquilla  $\beta$  se cribó con el objetivo de encontrar inhibidores de la formación del apoptosoma utilizando el mismo esquema de ensayo utilizado para la quimioteca de pseudopéptidos. Los resultados obtenidos a partir del cribado de la quimioteca a una concentración de 0,5 mg/mL mostraron inhibiciones en el caso de algunas mezclas pero no se observó reproducibilidad en los resultados. La concentración de ensayo de esta quimioteca quedó limitada por la concentración inicial de las mezclas, junto con la concentración de DMSO y el volumen de mezcla máximos que admitía en el ensayo.

La quimioteca de helices- $\alpha$  se cribó con el objetivo de encontrar péptidos capaces de inducir la activación de PC9 independientes de Cit c en el ensayo. El esquema de reacción consistió en la preincubación de las mezclas a 2 mg/mL con Apaf-1 y posterior adición de PC9 y ATP, pero no Cit c. No se encontraron actividades miméticas de Cit c inductoras de la formación del apoptosoma en las condiciones ensayadas.

### **3.12. Diseño racional de moduladores: péptidos derivados de Cit c**

Cit c es una proteína muy utilizada en las comparaciones evolutivas ya que se encuentra en la cadena de transporte electrónico de todos los organismos aeróbicos. Su secuencia primaria en la mayoría de las especies se encuentra altamente conservada a pesar de las diferencias evolutivas. Tal es el caso de los citocromos de levadura y humano: de un total de 104 residuos, 49 son idénticos entre ambas especies. A lo largo de la evolución, en el paso de un organismo



unicelular a un metazoo más complejo, algunas proteínas han adquirido funciones múltiples y participan en rutas metabólicas distintas. Entre los ejemplos de adquisición de nuevas funciones de algunas proteínas se encuentra la de regulador apoptótico de Cit c de mamíferos. Esa divergencia adquirida, alberga una de las claves de las diferencias funcionales entre los citocromos de levadura y mamíferos. Así, Cit c de levadura no es capaz de unirse a Apaf-1 e iniciar la activación de caspasas *in vitro*. Este hecho llevó al grupo de investigación del Dr. McLendon a estudiar las diferencias entre los Cit c de caballo (HCc) y levadura (YCc) para caracterizar el epítipo de reconocimiento de Cit c por Apaf-1. Realizaron un estudio mutacional utilizando dos colecciones de mutantes de Cit c complementarias y su análisis mediante reacciones de reconstitución de apoptosomas *in vitro*. Por un lado residuos de HCc fueron sustituidos por los residuos equivalentes en la secuencia de levadura. Estas mutaciones correlacionaban con una pérdida de capacidad de unión a Apaf-1 y de activación de caspasas. Alternativamente la sustitución de residuos de YCc por sus equivalentes en caballo, resultaron en la ganancia de actividad inductora de apoptosis en los mutantes de levadura. Los residuos más importantes implicados en la unión a Apaf-1 resultaron ser las lisinas 7, 25, 39, 72 y el fragmento 62-65 de la secuencia primaria de HCc. También resultaron especialmente relevantes para la actividad la eliminación de los 5 residuos N-terminales de YCc, así como algunas modificaciones postraduccionales como la lisina trimetilada en posición 72 (Kluck *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2001).

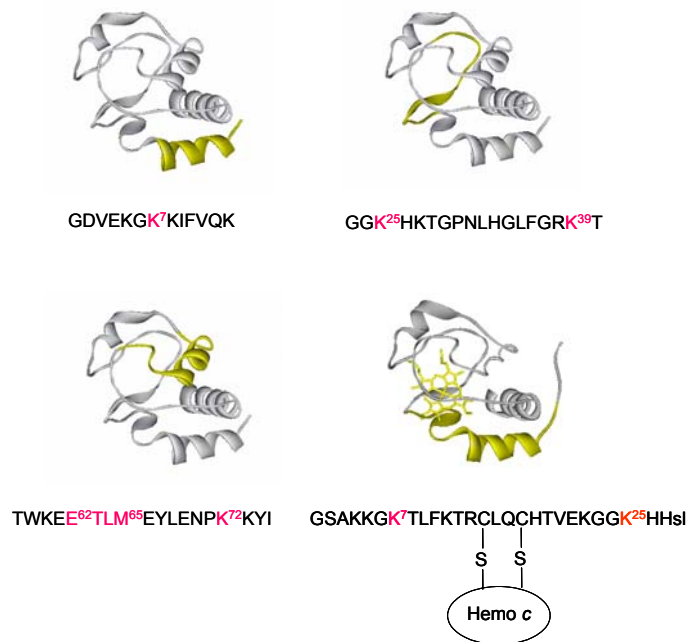
Una estrategia común en el diseño de inhibidores de interacciones proteína-proteína una vez conocido el sitio de unión, es la utilización de péptidos que contengan los residuos esenciales del epítipo de unión (Cochran *et al.*, 2000, Zutshi *et al.*, 1998). Tomando como punto de partida las investigaciones publicadas, en nuestro laboratorio se sintetizaron tres péptidos en fase sólida mediante química FMOC, que contenían los 7 residuos descritos en este trabajo como determinantes para el reconocimiento y unión de Cit c a Apaf-1. Los péptidos comprendían las regiones de la secuencia primaria de HCc: 1-13, 23-40 y 58-75 y se representan en la Figura 42.

Además, en el laboratorio del Dr. Jordi Bujons (Departament de Química Orgànica Biològica, IIQAB-CSIC, Barcelona) se sintetizó un péptido de 27 aminoácidos derivado de YCc que conserva unido el grupo prostético de hemo c presente en el citocromo. Este hemopéptido, sintetizado por Noemí Marina (miembro del citado laboratorio), se obtuvo a partir de la

## Identificación de moduladores del apoptosma

expresión en bacterias (Pollock *et al.*, 1998) y posterior procesamiento de un mutante de YCc que contenía las siguientes mutaciones: YCc (D-5→ -1 / A7K / P25K / K27M / TML72K / C102T).

La delección de los 5 residuos N-terminales y la introducción de dos residuos de lisina en las posiciones 7 y 25 asemejarían el péptido a la secuencia equina. La sustitución de la lisina 27 por metionina se introdujo para realizar posteriormente un tratamiento de degradación del citocromo con bromuro de cianógeno a ese nivel y así permitir la purificación del correspondiente fragmento N-terminal.



**Figura 42. Péptidos derivados de Cit c sintetizados.** Se representa la secuencia primaria de los péptidos y se indica en color amarillo la región en la estructura de Cit c a la que corresponden. Los residuos coloreados en rojo representan aminoácidos que constituyen el epítipo de reconocimiento de Cit c por Apaf-1 y por tanto relevantes para la unión de ambas proteínas. Los péptidos Cit a1, Cit a2 y Cit a3 corresponden a los aminoácidos 1-13, 23-40 y 58-75, respectivamente, de la secuencia primaria HcC. HHSI: homoserinlactona.

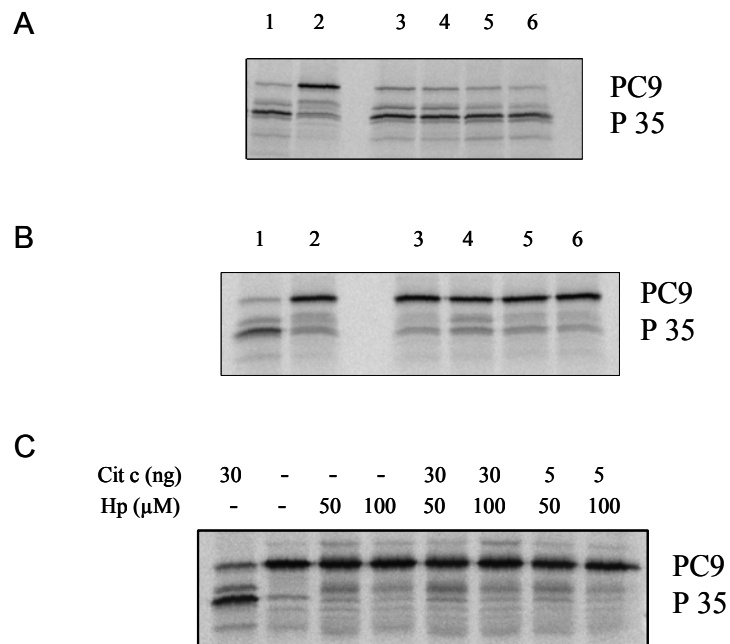
Se abordó la exploración de las diferentes estructuras peptídicas basadas en las estructuras de HcC y YCc, con objeto de obtener moléculas de menor tamaño capaces de inhibir o promover la

activación de caspasas dependiente del apoptosoma.

Se esperaba que si la interacción tuviese lugar, pudieran darse dos posibilidades: que por un lado, dado el menor tamaño de estos fragmentos y el carácter parcial de esta interacción, dichas moléculas no fuesen capaces de provocar el cambio conformacional en Apaf-1 que desemboca en la formación del apoptosoma, pero que perturbasen la interacción con Cit c y potencialmente actuasen como inhibidores competitivos del apoptosoma. O podría ocurrir que la interacción fuese suficiente para inducir la oligomerización de Apaf-1 dando lugar al apoptosoma y por tanto la acción de dichas moléculas emulase el efecto proapoptótico de Cit c. Una tercera posibilidad, aunque a priori menos probable, es que tuviese lugar la interacción con Apaf-1 pero que ésta no perturbe la interacción con Cit c.

No se observó actividad inhibidora o activadora al ensayar los tres péptidos derivados de Cit c a una concentración final en el ensayo de 100  $\mu$ M, pero sí se observó actividad inhibidora en el caso del hemopéptido (Figura 43). En siguientes experimentos se confirmó el efecto dosis dependiente de la inhibición del procesamiento de PC9 por el hemopéptido. La inhibición se comenzaba a observar en el ensayo a partir de 50  $\mu$ M. A pesar de que añadiendo al mismo tiempo el hemopéptido y Cit c no se producía inhibición, no se observó necesidad de preincubación de más de 5 min. La continuación del estudio del efecto del hemopéptido sobre Apaf-1 se lleva a cabo en la actualidad en el laboratorio del Dr. Jordi Bujons, con quien iniciamos la colaboración.

## Identificación de moduladores del apoptoma



**Figura 43. Análisis de los péptidos derivados de Cit c y el hemopéptido.** (A) Péptidos derivados de Cit c ensayados como inhibidores de la interacción Cit c-Apaf-1. (1) Control positivo, (2) Control negativo en ausencia de Cit, (3-5) Péptidos: Cit a1, Cit a2, Cit a3 ensayados a 100 µM, (6) Mezcla de los péptidos Cit a1, a2 y a3 ensayados a 50 µM cada uno. (B) Péptidos ensayados como activadores en ausencia de Cit c. (1) Control positivo con Cit c (2) Control negativo sin Cit c, (3-5) Péptidos Cit a1, Cit a2, Cit a3 ensayados a 100 µM, (6) Mezcla de los tres péptidos ensayados a 50 µM cada uno. (C) Hemopéptido ensayado como inhibidor (Cit c: 30 ng), activador (Cit c: 0), o ensayado a concentraciones limitantes de Cit c (5 ng), a las concentraciones indicadas.

## 4. Caracterización Molecular del Mecanismo de Inhibición de los Pseudopéptidos

---

Los resultados obtenidos mostraban reproducibilidad en la inhibición del procesamiento de PC9 mediada por el grupo de pseudopéptidos identificados partir del cribado de quimiotecas combinatorias. Durante la realización del presente trabajo y hasta la actualidad, no se había descrito en la literatura ningún inhibidor directo del apoptosoma que interaccionase con Apaf-1. Existen evidencias, en modelos celulares, de la existencia de mecanismos todavía no caracterizados que conducen a la formación de un apoptosoma cuya actividad es deficiente (Wolf *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2002) por lo que la utilización de inhibidores del apoptosoma podría servir como herramienta para aportar información acerca de aspectos de su fisiología aun no bien caracterizados. Como objetivos de este capítulo se plantearon la caracterización del mecanismo molecular de la inhibición mediada por el peptoide 1a en este sistema, y por otro lado, con el fin de analizar el posible papel protector frente apoptosis de los compuestos, dado el posible potencial terapéutico que podría derivarse de moléculas que tuviesen como diana de inhibición el apoptosoma, se realizó un primer estudio *in vivo* de actividad.

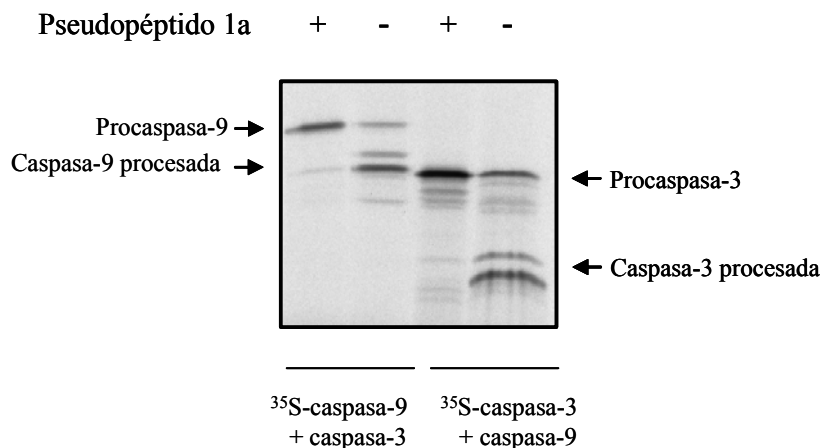
### 4.1. Análisis del procesamiento de procaspasa 3 en ensayos *in vitro*

El procesamiento de PC9 *in vitro* ocurre cuando las moléculas de PC9 aumentan su concentración local en el apoptosoma. Aunque la zimogenicidad de caspasa 9 es de 1:1000 libre o unida al apoptosoma respectivamente (Rodríguez *et al.*, 1999) se ha descrito que caspasa 9 puede ser activada sin procesamiento proteolítico (Stennicke *et al.*, 1999a). La unión de PC9 a Apaf aumenta su actividad catalítica intrínseca lo que conlleva el corte proteolítico de las moléculas de PC9 en Asp<sup>315</sup> dando lugar a las subunidades p35 y p12 dando lugar a moléculas de caspasa 9 más activas (Zou *et al.*, 2003). Además, cuando esto ocurre, los cuatro aminoácidos N-terminales de la subunidad pequeña p12 constituyen un nuevo epítipo de

## Caracterización Molecular de la Inhibición

reconocimiento del dominio BIR de proteínas IAPs, como XIAP, o ML-IAP por lo que el procesamiento de PC9 en células tiene además la función de regular negativamente el apoptosoma. Esta inhibición resulta neutralizada por proteínas como SMAC, que se exportan al citoplasma en caso de desestabilización de la mitocondria (apartado 1.3.) (Du *et al.*, 2000, Srinivasula *et al.*, 2001a, Shi *et al.*, 2002b).

Con el objetivo de analizar la actividad de PC9 y confirmar que la inhibición del procesamiento de PC9 mediada por los pseudopéptidos correlacionaba con la inhibición del procesamiento de uno de sus sustratos fisiológicos más directos, PC3, se realizaron reacciones de reconstitución de apoptosomas en presencia de peptoide 1a utilizando PC3 marcada radiactivamente (apartado 2.3.). Como se muestra en la Figura 44, la presencia del peptoide 1a en la reacción tuvo como consecuencia la conservación de PC3 en forma zimógeno. La inhibición del procesamiento de PC3 se produjo en el mismo orden de concentraciones en que el pseudopéptido 1a es activo para inhibir el procesamiento de PC9. Por tanto el pseudopéptido 1a inhibe tanto el procesamiento como la actividad de PC9 y como consecuencia, impide la activación de PC3.



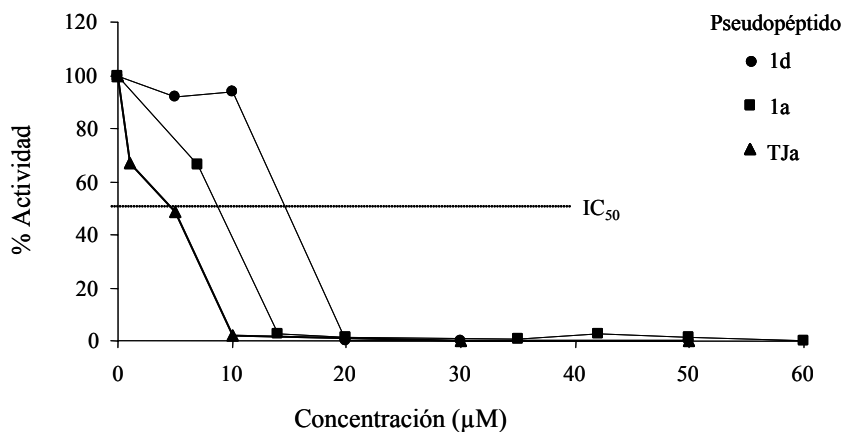
**Figura 44. Análisis del procesamiento de PC9 y PC3 *in vitro* inducidos por Cit c en presencia de peptoide 1a.** Las mitades izquierda y derecha del gel corresponden a reacciones de activación de PC9 y PC3 respectivamente, en presencia o ausencia de pseudopéptido 1a, y conteniendo 3µl de PC9 y PC3 transcritas y traducidas *in vitro*, de las cuales una está marcada radiactivamente, según se indica. En todos los casos 200 ng Apaf-1 se preincubaron con pseudopéptido 1a 20 µM o tampón A, 15 min 30 °C, tras lo cual se indujo la formación de apoptosomas mediante la adición de 30 ng de Cit c y procaspasas, en un volumen final de 23 µl.

#### 4.2. Inhibición de la activación de caspasas en extractos celulares

Uno de los sistemas más extendidos para estudiar distintos aspectos del proceso apoptótico es la utilización de extractos libres de células (Fearnhead, 2001). La importancia del papel de la mitocondria en apoptosis se observó por primera vez utilizando extractos celulares (Newmeyer *et al.*, 1994). Se han utilizado extractos para investigar como se producen los cambios apoptóticos en el núcleo y en la mitocondria (Lazebnik *et al.*, 1993, 1994, 1995), para identificar caspasas que se activan durante la apoptosis y sus sustratos (Lazebnik *et al.*, 1994, Nicholson *et al.*, 1995, Takahashi *et al.*, 1996), para caracterizar los mecanismos de activación (Fearnhead *et al.*, 1997), así como para identificar otras proteínas que desempeñan papeles clave en la regulación del proceso apoptótico (Liu *et al.*, 1996, 1997, Susin *et al.*, 1999, Zou *et al.*, 1997). En concreto, es posible reproducir la activación de caspasa 9 en extractos de células 293 y analizarla mediante un ensayo fluorogénico que utiliza un sustrato artificial de caspasa 3 (apartado 5.7.2.2.). Por ello, para estudiar los efectos de los pseudopéptidos sobre la activación de caspasas en extractos *in vitro* se utilizaron extractos celulares activables por ATP y deficientes en Apaf-1. Esta parte del trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Howard O. Fearnhead, donde se disponía de la metodología adecuada para el estudio de la apoptosis en extractos. Los extractos se obtienen por fraccionamiento mediante cromatografía de intercambio aniónico del extracto citoplasmático S-100 de células 293, y contienen distintos componentes de la maquinaria apoptótica pero carecen de otra parte de ellos (apartado 5.7.2.1., Figura 60). Las fracciones de extracto denominadas “FT” carecen de Apaf-1, pero contienen PC9, PC3 y Cit c, por lo que en ellos la activación de caspasas se lleva a cabo por complementación de los extractos con Apaf-1 recombinante y adición de ATP o dATP. La actividad caspasa 3 se valoró mediante ensayo proteasa utilizando un sustrato fluorogénico de la misma (apartado 5.7.2.2.). Para validar los resultados observados anteriormente en este nuevo sistema y caracterizar la IC<sub>50</sub> de los pseudopéptidos, se realizaron diluciones seriadas de los pseudopéptidos 1a, 1d y TJa. Se preincubaron los diferentes peptoides a distintas concentraciones a 30 °C durante 30 min con Apaf-1 recombinante, tras lo cual se combinaron con una alícuota de fracción de extracto FT y ATP. Las reacciones se incubaron 30 min a 37 °C y se cuantificó la actividad caspasa 3 mediante el seguimiento de la hidrólisis del sustrato fluorogénico Ac-DEVD-afc y liberación de

## Caracterización Molecular de la Inhibición

afc. El resultado se expresó como unidades de fluorescencia arbitrarias por minuto (UFA/min) y se calculó el porcentaje de actividad relativo al control positivo (100% de actividad) en el cual Apaf se preincubó únicamente con tampón. En la Figura 45 se muestra el porcentaje de actividad caspasa 3 en los extractos en los que se encuentran presentes cada uno de los peptoides 1a, 1d, o TJa, a distintas concentraciones, respecto a la actividad del control positivo.



**Figura 45. Titulación de la capacidad inhibidora de los pseudopéptidos.** Diluciones seriadas de los pseudopéptidos se preincubaron con Apaf-1, 30 min, 30 °C, en un volumen de 5 µl, tras lo cual se adicionaron 4 µl de fracción FT y ATP 1 mM y se incubaron 30 min, 37 °C. 3 µl de las reacciones se utilizaron para monitorizar la actividad DEVDasa. Se representa el porcentaje de activación relativo al control positivo en ausencia de pseudopéptido.

Los pseudopéptidos mostraron capacidad de inhibir la actividad caspasa 3 inducida por ATP y Apaf-1 en el extracto de forma dosis dependiente. Las IC<sub>50</sub> de los pseudopéptidos 1a y TJa resultaron ser menores de 10 µM. El pseudopéptido 1d resultó ser ligeramente menos activo que los peptoides 1a y TJa con una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 15 µM.

No fue posible compatibilizar el esquema de reacción utilizado en estudios previos de inhibición con el estudio de los peptoides en ensayos con extractos S-100. Preincubaciones del extracto S-100 de más de 5 min a la temperatura del ensayo resultaban en una pérdida considerable de la actividad del extracto, hecho que no ocurrió con las fracciones de extracto FT ó F1 (apartado 4.9.). No se observó inhibición sin preincubación en extractos FT y S-100 o con



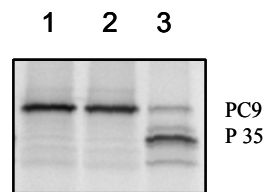
preincubación de 10 min previa de Apaf-1 con el compuesto a 30 °C en fracciones FT. No se puede descartar la existencia de moléculas endógenas antagonistas del peptoide presente en el extracto S-100 y no en la fracción FT, que no pudiesen competir con el peptoide por Apaf-1 al ser aislado durante la preincubación. Además, este resultado indicaba que las caspasas no eran la diana de inhibición de los pseudopéptidos.

#### **4.3. Efecto de los pseudopéptidos sobre la oligomerización de Apaf-1**

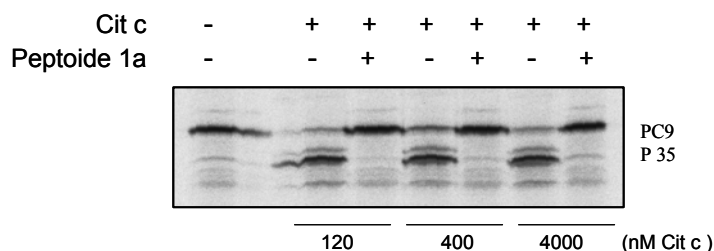
La secuencia de formación del apoptosoma implica que la unión de Cit c a Apaf-1 es un requisito previo para que éste adopte una conformación que le permita unir ATP y oligomerizar. Para analizar si la inhibición mediada por los peptoides dependía del estado de oligomerización de Apaf-1, se hizo variar el orden de preincubación de los componentes de la reacción de inhibición en el ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro*. De forma habitual se observaba inhibición cuando el peptoide 1a era preincubado con Apaf-1 y posteriormente se añadían Cit c y PC9. En una reacción paralela se invirtió la secuencia de incubación del pseudopéptido 1a y Cit c, siendo Cit c preincubado en primer lugar con Apaf-1 durante 15 min. La oligomerización inducida por Cit c es un proceso relativamente rápido. En el sistema de ensayo de componentes purificados *in vitro*, comienza a observarse aparición de las subunidades de PC9 a partir de los 2-5 min (Figura 24) y en las fracciones FT la activación de caspasas y el consumo de Ac-DEVD-afc es prácticamente instantánea (menor 1 min), una vez se estimulan con ATP y Apaf. Reacciones en las que se indujo la oligomerización con Cit c, anterior a la preincubación con el pseudopéptido 1a, resultaron igualmente en inhibición, indicando que el pseudopéptido 1a inhibe el procesamiento de PC9 dependiente del apoptosoma incluso cuando Apaf-1 se encuentra oligomerizado (Figura 46).

Un experimento que se realizó para descartar que el peptoide 1a compitiese con Cit c por la unión a Apaf-1 partía de la consideración de que esperaríamos ver un descenso de la inhibición por la presencia de cantidades crecientes de Cit c, en el caso de que ésta fuese competitiva. Para comprobar si la adición de excesos de Cit c eran capaces de revertir el efecto inhibitorio producido durante la preincubación de Apaf-1 con el peptoide, se añadieron cantidades de Cit c

**Figura 46. Variación de la secuencia de incubación de Cit c y pseudopéptido 1a en reacciones de reconstitución de apoptosomas *in vitro*.** (1) Apaf-1 se preincubó con pseudopéptido 1a 20  $\mu$ M 15 min, 30  $^{\circ}$ C. Después se estimuló con Cit c 15 min, 30  $^{\circ}$ C. (2) Apaf-1 se preincubó con Cit c 15 min, 30  $^{\circ}$ C, a continuación se añadió pseudopéptido 1a 20  $\mu$ M, y la mezcla se incubó 15 min 30  $^{\circ}$ C. (3) Control positivo preincubado con tampón A 30 min, 30  $^{\circ}$ C. Tras las preincubaciones se añadió PC9 dejando progresar la reacción durante 1 hora a 30  $^{\circ}$ C.



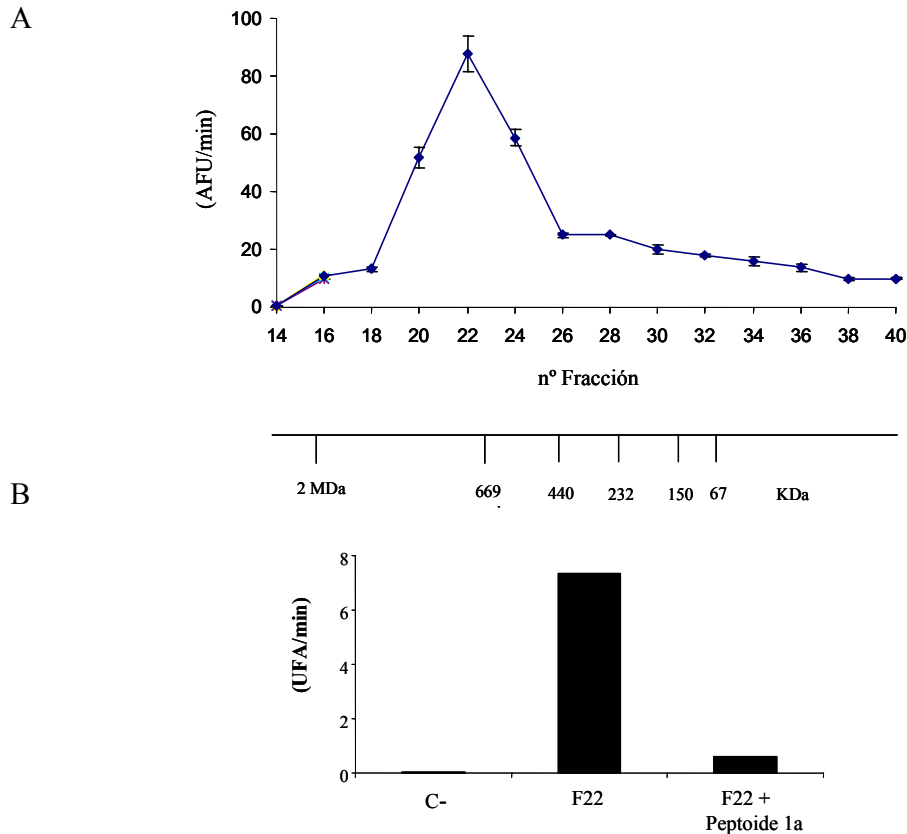
hasta 30 veces superior a las habitualmente utilizadas en los ensayos de activación. La concentración mínima capaz de inducir la oligomerización de Apaf-1 en el ensayo fue 120 nM, por lo que 400 y 4000 representaban excesos de Cit c en nuestras condiciones de laboratorio. Como se muestra en la Figura 47, ninguna de las concentraciones de Cit c ensayadas mostró reversión del efecto inhibitor del pseudopéptido 1a sobre Apaf-1. Ahora bien, añadidos al mismo tiempo (tiempo cero) el pseudopéptido 1a no era capaz de competir con Cit c por Apaf-1 como se demostró en el experimento que analizaba el efecto variación del tiempo de preincubación sobre la inhibición (Figura 40, apartado 3.10.).



**Figura 47. Ensayo de competencia entre Cit c y el pseudopéptido 1a.** Apaf-1 fue preincubado con el pseudopéptido 1a 20  $\mu$ M, 20 min 30  $^{\circ}$ C. Tras la preincubación se añadieron PC9 y Cit c a distintas concentraciones y las reacciones se incubaron 1 hora, 30  $^{\circ}$ C.

Para confirmar la hipótesis de que el pseudopéptido 1a inhibía el apoptosoma oligomerizado, se realizó un experimento que consistió en aislar apoptosomas potencialmente activos para activar caspasas (Cain *et al.*, 1999) y exponerlos a inhibición. Para ello, se llevó a cabo una

reacción de oligomerización en la que Apaf-1 fue preincubado con Cit c 3  $\mu$ M, 15 min a 30  $^{\circ}$ C en presencia de ATP. El producto de esta reacción se sometió a cromatografía de filtración en gel (apartado 5.6.1.2.) y las fracciones resultantes de la cromatografía se analizaron respecto a su potencial activador de extractos FT mediante la valoración de su actividad DEVDasa. El perfil cromatográfico mostró un pico de actividad principal centrado en la fracción correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 700 kDa (Figura 48, A). Una alícuota



**Figura 48. Ensayo de inhibición de apoptosomas activos de 700 kDa, aislados mediante cromatografía de filtración en gel.** (A) Se llevaron a cabo reacciones de oligomerización de Apaf-1 preincubado en ausencia y presencia del pseudopéptido 1a 20 min, 30  $^{\circ}$ C, con 3  $\mu$ M Cit c y ATP 1 mM. Las reacciones se fraccionaron mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superosa 6. (B) 4  $\mu$ l de la fracción 22 se preincubaron en presencia o ausencia de pseudopéptido 1a 50  $\mu$ M durante 20 min, 30  $^{\circ}$ C. Tras este tiempo se añadieron 4  $\mu$ l de FT y ATP 1 mM en un volumen total de 10  $\mu$ l y se midió la actividad DEVDasa. C (-): control negativo en ausencia de F22.

de la fracción 22 correspondiente al oligómero activo de Apaf-Citc y de ~ 700 kDa se utilizó para realizar un experimento de inhibición por el peptoide 1a (Figura 48, B). La incubación de los oligómeros con el peptoide 1a de nuevo resultó en la obtención de complejos incapaces de activar las caspasas presentes en la fracción FT. En función de estos resultados, se descartó la posibilidad de inhibición a nivel de la interacción Cit c-Apaf-1 ó entre los monómeros de Apaf-1 para formar el oligómero. Este resultado parece indicar que el peptoide 1a afectaría a la actividad del oligómero, en un paso posterior a la oligomerización de Apaf-1.

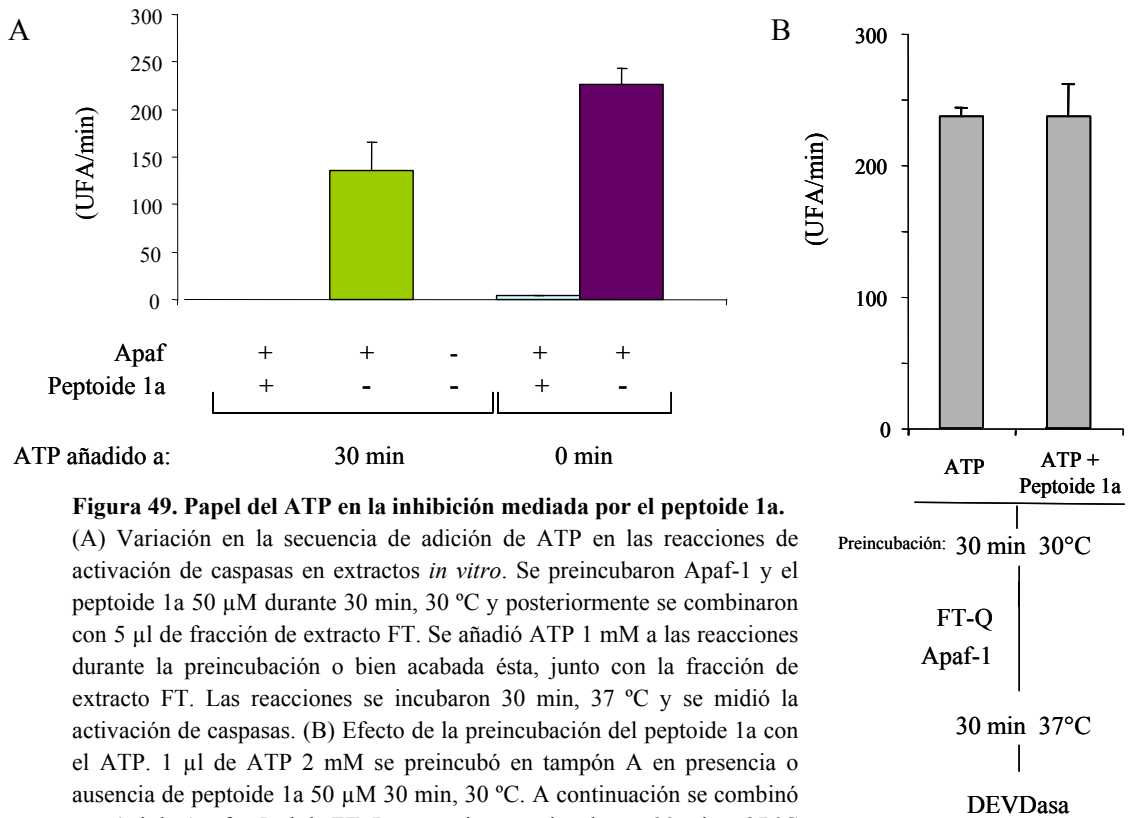
#### **4.4. Papel del ATP en la inhibición mediada por el peptoide 1a.**

Se piensa que el dominio central de Apaf-1, CED4, es el dominio a través del cual Apaf-1 oligomeriza. En este dominio se han encontrado secuencias conservadas de unión a nucleótidos Walker's A (Loop P) y cajas B, que podrían indicar que además se tratase de un dominio ATPasa (apartado 1.5.) (Zou *et al.*, 1997). El mecanismo a través del cual el ATP interviene en la formación del apoptosoma no se ha caracterizado en la actualidad. El hecho de la conservación evolutiva de este dominio, presente en *C.elegans* (Yang *et al.*, 1998), y las diferencias de requerimiento de ATP para activar caspasas en los distintos ensayos (1 mM en extractos 293 y 0,1 mM en el ensayo de reconstitución *in vitro*) sugieren la existencia de mecanismos adicionales de regulación de la activación de caspasas inducida por Cit c.

En los experimentos de cribado y caracterización de los peptoides utilizando el ensayo de reconstitución de apoptosomas el ATP se encontraba presente en la preincubación de Apaf con los compuestos. Para comprobar si la inhibición mediada por el peptoide 1a requería ATP para tener lugar, se realizaron reacciones de inhibición en ensayo en extractos añadiendo ATP durante (tiempo cero) y después de la preincubación (tiempo 30 minutos). Se observó que no era necesaria la presencia de ATP para que el peptoide 1a ejerciese inhibición sobre Apaf-1, así como tampoco existía una competencia entre el ATP y el peptoide por Apaf-1 (Figura 49, A).

La preincubación del peptoide 1a con el ATP no aumentó el requerimiento de nucleótido en el ensayo, al menos en las condiciones analizadas, ya que la preincubación de ambos durante 30 min a 30 °C no se tradujo en una disminución de la actividad DEVDasa. Ello indica que el

potencial del ATP para activar caspasas dependiente del apoptosoma no se vió afectado por la presencia de peptoide (Figura 49, B). La secuencia de adición del ATP a la reacción no afectó al resultado de la inhibición (Figura 49, A). Sin embargo, se observó un ligero descenso de la activación de los extractos en los controles positivos de actividad cuando se añadía ATP tras los 30 minutos de preincubación. Experimentalmente se comprobó que Apaf-1 perdía parte de su actividad proporcional al tiempo de preincubación a 30 o 37 °C. Esta pérdida de actividad fue significativamente menor si la preincubación se realizaba en presencia de ATP, hecho que se reprodujo en el caso de la activación de caspasas mediante combinación de extractos F1 y FT (datos no mostrados) (apartado 4.9.). Estas observaciones indicarían que la diferencia de actividad DEVDasa observada entre los dos controles se podría deber a un efecto “protector” de la actividad de Apaf-1 por parte del ATP.



**Figura 49. Papel del ATP en la inhibición mediada por el peptoide 1a.**

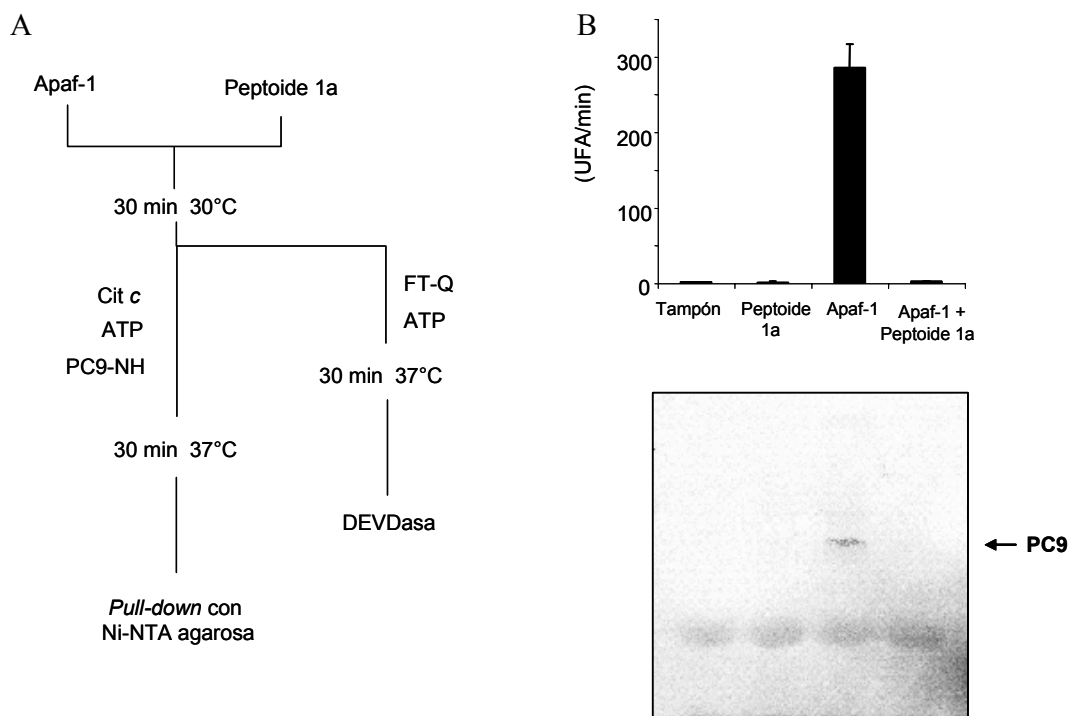
(A) Variación en la secuencia de adición de ATP en las reacciones de activación de caspasas en extractos *in vitro*. Se preincubaron Apaf-1 y el peptoide 1a 50 µM durante 30 min, 30 °C y posteriormente se combinaron con 5 µl de fracción de extracto FT. Se añadió ATP 1 mM a las reacciones durante la preincubación o bien acabada ésta, junto con la fracción de extracto FT. Las reacciones se incubaron 30 min, 37 °C y se midió la activación de caspasas. (B) Efecto de la preincubación del peptoide 1a con el ATP. 1 µl de ATP 2 mM se preincubó en tampón A en presencia o ausencia de peptoide 1a 50 µM 30 min, 30 °C. A continuación se combinó con 1µl de Apaf y 5 µl de FT. Las reacciones se incubaron 30 min a 37 °C y se midió la actividad DEVDasa.

#### 4.5. Interacción de procaspasa 9 con el apoptosoma

En la secuencia de la formación del apoptosoma, una vez los monómeros de Apaf-1 han oligomerizado, éstos son capaces de reclutar PC9 formando un holoenzima activo (Rodríguez *et al.*, 1998). Los estudios de modelización molecular de la estructura del apoptosoma proponen la formación de un surco central en el cual las moléculas de PC9 interactúan a través de los dominios CARD presentes en Apaf-1 y PC9 (Acehan *et al.*, 2002). El aumento de la concentración local de PC9 en el complejo tiene como consecuencia que las moléculas de PC9 se autoprosesen entre ellas para dar lugar a sus formas activas (Salvesen *et al.*, 1999). Una molécula que actuase como antagonista de la unión de PC9 al complejo tendría como resultado la inactividad de los oligómeros de Apaf-1-Cit c.

Para comprobar si los apoptosomas expuestos a inhibición por el pseudopéptido 1a eran capaces de reclutar PC9 en el complejo, se realizó un experimento de *pull-down*. Para el experimento se utilizó un mutante de PC9 no hidrolizable (PC9 NH), que contiene la mutación: Cys 287 → Ser (Fearnhead *et al.*, 1998). Esta mutación sustituye una de las cisteínas del centro activo del enzima por serina e inactiva la enzima evitando el autoprosesado, facilitando el análisis experimental. PC9 NH se obtuvo mediante transcripción/traducción *in vitro* utilizando el mismo procedimiento de síntesis y marcaje radiactivo que en el caso de PC9 salvaje (apartado 5.6.1.3.). Se realizaron reacciones de inhibición y controles respectivos utilizando el ensayo de activación de PC9 *in vitro*.

Se preincubó Apaf-1 con pseudopéptido 1a, tras lo cual se adicionaron Cit c y PC9 NH. Las reacciones se dejaron progresar 1 h a 30 °C, en un volumen de 20 µL. Una alícuota de las reacciones se utilizó para medir la activación de caspasas utilizando fracción FT y ATP, antes de realizar el ensayo de *pull-down*, como control de actividad. Para el *pull-down* se utilizaron microesferas de níquel agarosa ya que Apaf-1, se había expresado como proteína de fusión a una cola de 9 histidinas (apartado 5.6.3.). Tras el *pull-down* las reacciones se resolvieron mediante SDS-PAGE y la presencia de PC9 NH se visualizó mediante autorradiografía. Como se muestra en la Figura 50, los resultados mostraron que, en el caso del control positivo, Apaf-1 efectivamente arrastró PC9 NH, no así el Apaf-1 que fue preincubado con el pseudopéptido 1a, indicando que PC9 no estaba retenida en el apoptosoma inhibido.

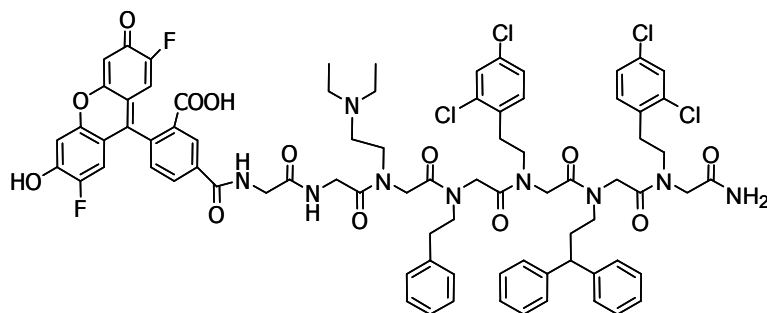


**Figura 50. Interacción de PC9 con el apoptosoma mediante ensayo de *pull-down*.** (A) Esquema experimental. Se llevaron a cabo reacciones de reconstitución de apoptosomas utilizando PC9 NH en presencia o ausencia de pseudopéptido 1a 50  $\mu$ M. Una alícuota de las reacciones se combinó con FT y ATP y se midió la actividad DEVDasa. El resto del volumen de reacción se incubó con microesferas de níquel agarosa, tras lo cual las reacciones se lavaron con tampón A para eliminar la fracción no retenida. Tras el último lavado las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE. Como controles negativos se ensayaron tampón A y el pseudopéptido 1a 50  $\mu$ M en tampón A. (B) Actividad DEVDasa de las reacciones y autorradiografía.

#### 4.6. Estudio de la interacción entre Apaf-1 y el pseudopéptido 1a

Los resultados anteriores sugerían que la diana de inhibición de los pseudopéptidos era la proteína Apaf-1, pero no se había demostrado la interacción física entre ambos.

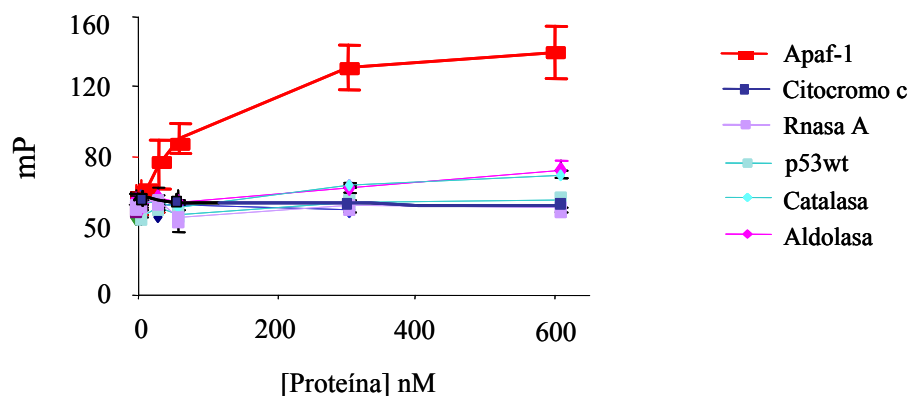
El análisis de la capacidad de interacción del pseudopéptido 1a con Apaf-1 se realizó mediante un ensayo de polarización de la fluorescencia. Para ello se sintetizó una versión fluorescente del pseudopéptido 1a covalentemente unido al fluoróforo 5'-6'-carboxifluoresceína (peptide 1a fl), cuya estructura se muestra en la Figura 51.



**Figura 51. Estructura del pseudopéptido fluorescente 1a fl.**

Se llevó a cabo la titulación de Apaf-1 sobre una disolución 60 nM de pseudopéptido fluorescente. Se realizaron diluciones seriadas de Apaf-1 abarcando un rango de relaciones molares entre (0,1:1) y (10:1) de Apaf-1: peptoide fluorescente, respectivamente (apartado 5.9.). Los resultados obtenidos permitieron confirmar la interacción física entre Apaf-1 y el pseudopéptido (Figura 52), que resultó tener una constante de disociación  $K_d$  57 nM, según cálculos realizados mediante un modelo de ajuste exponencial. En un experimento de polarización de la fluorescencia complementario, se tituló Cit c como control negativo de unión, hasta una concentración final de 1000 nM y frente a una disolución 60 nM del peptoide fluorescente. No se observaron cambios en la polarización de la fluorescencia de la disolución a medida que aumentaba la concentración de Cit c. En la Figura 52 se representan los resultados obtenidos hasta 600 nM. Con este experimento se pretendía demostrar que el ligando del peptoide es Apaf-1, y no Cit c. Por tanto, los resultados obtenidos estarían de acuerdo con una actuación del peptoide 1a sobre Apaf y no sobre otros componentes del apoptosoma. Además, con el fin de estudiar la especificidad del pseudopéptido 1a fl se realizaron titulaciones de otras proteínas frente al peptoide en las mismas condiciones utilizadas para el caso de Apaf y Cit c. No se observó variación en la polarización de la fluorescencia, y por tanto unión, para el caso de proteínas como aldolasa, catalasa, ribonucleasa A, el dominio de tetramerización de p53. Sin embargo sí se observó unión inespecífica a proteínas transportadoras: tiroglobulina, ferritina, y hemocianina.





**Figura 52. Curva de unión del pseudopéptido 1a fl a Apaf-1, Cit c y proteínas control.** Las proteínas se titularon hasta una concentración de 600 nM. La concentración del pseudopéptido fluorescente fue 60 nM. Las muestras se incubaron a 30 °C, 30 min,  $\lambda_{exc}$ : 480,  $\lambda_{em}$ : 535.

#### 4.7. Efecto del pseudopéptido 1a sobre otros componentes del sistema

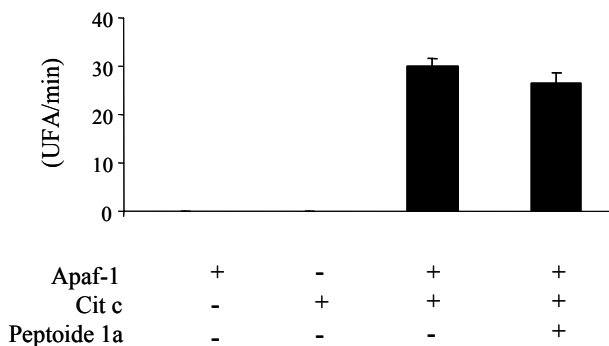
Para corroborar el resultado obtenido en el apartado anterior, en relación con la incapacidad del peptoide de interactuar con Cit c, se realizó un experimento para comprobar si el peptoide 1a tenía efecto inhibitorio sobre Cit c en ensayos con extractos. Para ello se utilizaron fracciones de extracto FT deficientes en Cit c y en Apaf (FT-S). Los extractos FT-S proceden de extractos FT que han sido sometidos a un tratamiento con microesferas de Q-Sepharosa para eliminar las moléculas de Cit c presentes en el extracto (apartado 5.7.2.1.; Fearnhead *et al.*, 1998). Se realizaron incubaciones de Cit c con peptoide 1a 50  $\mu$ M durante 30 min a 30 °C. Tras la incubación se adicionaron FT-S, Apaf y ATP para reconstituir la activación de caspasas y se midió la actividad DEVDasa. Los resultados se muestran en la Figura 53, donde se observa que no existe una reducción significativa de la activación de caspasas cuando se preincuba Cit c con el peptoide 1a como sucedía cuando se preincubaba con Apaf-1. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior en los que no se observó unión física entre el peptoide y Cit c, según experimentos de polarización de la fluorescencia.

Por otro lado, con el fin de analizar si el extracto FT perdía actividad al ser preincubado con el peptoide 1a debido a una unión inespecífica de éste con proteínas componentes del extracto,

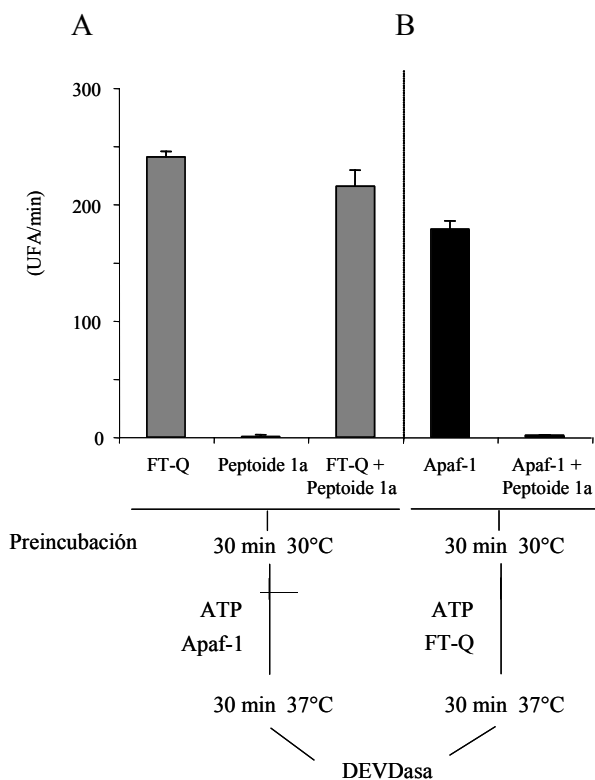
## Caracterización Molecular de la Inhibición

se llevaron a cabo preincubaciones de FT y peptoide en las condiciones utilizadas habitualmente. Como se observa en la Figura 54, al comparar los paneles A y B se puede concluir que el peptoide 1a no induce un descenso de la activación de caspasas significativo cuando se preincuba con extracto FT, en contraste con la reducción de actividad observada cuando el peptoide se preincuba con Apaf-1.

**Figura 53. Ensayo de activación de extractos FT-S vaciados de Cit c.** Cit c fue preincubado en presencia o ausencia de peptoide 1a 50  $\mu$ M durante 30 min, 30  $^{\circ}$ C, tras lo cual se combinaron con 1  $\mu$ l de Apaf, 1  $\mu$ l de ATP 10 mM, y 5 $\mu$ l fracción de extracto FT-S. Las reacciones se incubaron 30 min a 37  $^{\circ}$ C, tras lo cual se midió la actividad DEVDasa de las reacciones.



**Figura 54. Efecto de la preincubación de FT y el peptoide 1a en ensayos sobre la activación de caspasas en extractos.** (A) 5  $\mu$ l de extracto FT se preincubaron a 30  $^{\circ}$ C, 30 min con peptoide 1a 50  $\mu$ M, para posteriormente estimular la activación de caspasas mediante adición de Apaf-1 y ATP 1 mM. (B) Apaf-1 se preincubó a 30  $^{\circ}$ C, 30 min con peptoide 1a 50  $\mu$ M. Posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ l de extracto FT y ATP 1 mM. En ambos casos, tras la preincubación, las reacciones se incubaron 30 min, a 37  $^{\circ}$ C, tras lo cual se midió la actividad DEVDasa.



Un experimento adicional para analizar si el peptoide 1a tenía efecto inhibitorio sobre otras proteínas, además de Apaf-1, consistió en la preincubación del peptoide con PC9 transcrita y traducida *in vitro* y posterior exposición a la acción del apoptosoma. Los ensayos de reconstitución de apoptosomas *in vitro* revelaron que la preincubación de PC9 con el peptoide 1a 50  $\mu$ M, en las condiciones establecidas para otros ensayos (30 min, 30 °C), no afectaba a su procesamiento (datos no mostrados). Este hecho indica de nuevo que no existe un efecto directo del peptoide sobre las caspasas. En general, considerando los resultados expuestos, aunque no se ha hecho un estudio sistemático para evaluar la especificidad del peptoide por Apaf-1, si se puede considerar una acción específica del peptoide por Apaf-1 al menos en este sistema.

#### **4.8. Estudio del efecto del peptoide 1a sobre la formación y actividad del apoptosoma**

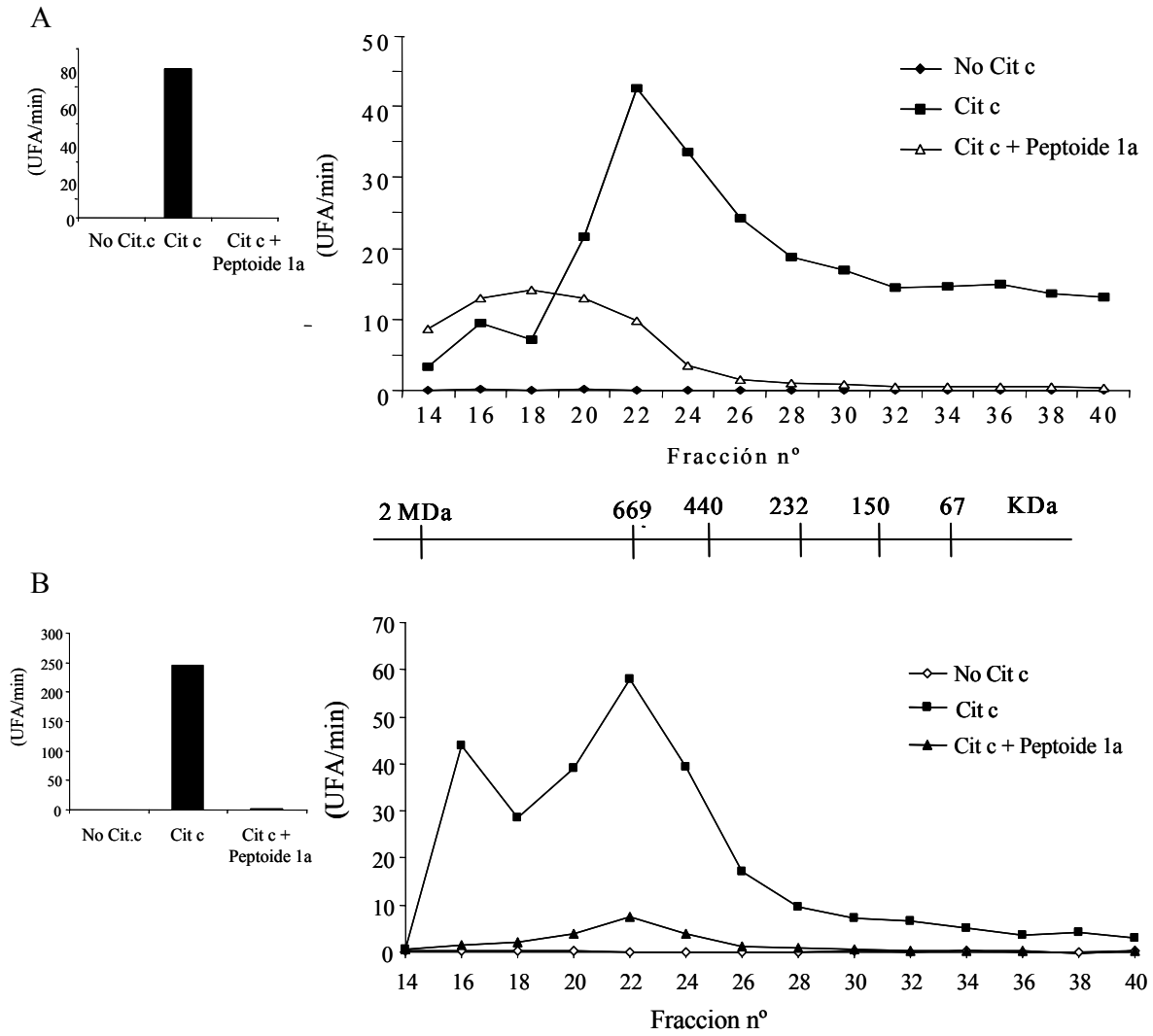
Como se explica en el apartado 1.5., se han identificado apoptosomas de distinto tamaño, composición y actividad en modelos celulares, en concreto un holoenzima de mayor actividad y de ~700 kDa y formas del complejo relativamente menos activas de ~1,4 MDa (Cain *et al.*, 1999, 2000, Bratton *et al.*, 2001b).

Los efectos del peptoide 1a sobre la formación del apoptosoma y el equilibrio entre las distintas formas del complejo, se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel. Siguiendo el esquema de reacción establecido, Apaf-1 se preincubó en presencia o ausencia del peptoide 1a y después se indujo la oligomerización en presencia de Cit c y ATP durante 15 min a 30 °C. El resultado de estas reacciones se sometió a filtración en gel y las fracciones se analizaron mediante ensayo de activación de caspasas. Previo a la filtración se tomaron alícuotas de las reacciones como comprobación de la actividad. El experimento se llevó a cabo con dos preparaciones de Apaf-1 distintas, en el primer caso se utilizaron 15  $\mu$ l de fracción 28 (4  $\mu$ g) obtenida mediante fraccionamiento por cromatografía de filtración en gel (Apaf-1 monomérico). En el segundo caso se utilizaron 25  $\mu$ g de Apaf-1 purificado utilizando columnas de níquel-agarosa.

En relación a la actividad de las fracciones, en el primer experimento (Figura 55.A), la incubación de Apaf-1 con Cit c y ATP indujo un cambio en el perfil cromatográfico desplazando las formas de Apaf-1 monoméricas de ~ 140 kDa hacia las oligoméricas

distribuidas en dos picos centrados en un peso molecular de  $\sim 700$  kDa y  $\sim 1,4$  MDa, correspondientes a los dos tipos apoptosomas descritos. La mayoría de la actividad se situó en el pico de 700 kDa, el apoptosoma más activo. Cuando la reacción se realizó en ausencia de Cit c no se observó cambio en la distribución de peso molecular de Apaf-1, encontrándose la mayoría de la proteína en el estado monomérico. A pesar de que tanto los *inputs* correspondientes a las muestras conteniendo peptoide 1a y el control en ausencia de Cit c no mostraron ninguna actividad, tras la filtración reapareció la actividad caspasa 3, pero únicamente en fracciones de pesos moleculares elevados, que podrían corresponder al apoptosoma de 1,4 MDa, o a complejos de mayor entidad. Este resultado sugería por un lado la existencia de cierta reversibilidad en la interacción del peptoide 1a con Apaf-1 y por otro, que Apaf-1 y el peptoide 1a podrían estar formando parte de un complejo de alto peso molecular. Los estudios de criomicroscopía electrónica parecían indicar que el apoptosoma de 1,4 MDa se forma por la dimerización de dos apoptosomas de 700 kDa, compuestos cada uno por 7 moléculas de Apaf-1 (Figura 4, Acehan *et al.*, 2002). Aunque la composición y actividad de los distintos tipos de apoptosomas no se han caracterizado suficientemente, publicaciones recientes (Beem *et al.*, 2004) indican que el apoptosoma de 1,4 MDa es un intermediario de la maduración del apoptosoma, y que la inhibición del apoptosoma mediante incremento del pH o de la concentración de iones  $K^+$  en extractos “captura” el apoptosoma en la forma de 1,4 MDa. Aunque el experimento mostrado en la Figura 55.A. podría inducir a pensar en la posibilidad de que el peptoide interviniere a nivel de maduración del apoptosoma, en las condiciones utilizadas en el experimento mostrado en la Figura 55, B no se reprodujo el resultado. En este caso, el control positivo mostró un perfil cromatográfico correspondiente a una distribución de los apoptosomas entre proporciones de apoptosoma de 700 kDa y 1,4 MDa. En presencia de peptoide 1a se observó inhibición de la actividad DEVDasa apareciendo un pico de menor actividad correspondiente a formas de  $\sim 700$  kDa.

Se observó cierta pérdida de actividad durante la preincubación a 30 °C, en comparación con resultados similares publicados en la literatura (Martin *et al.*, 2002).

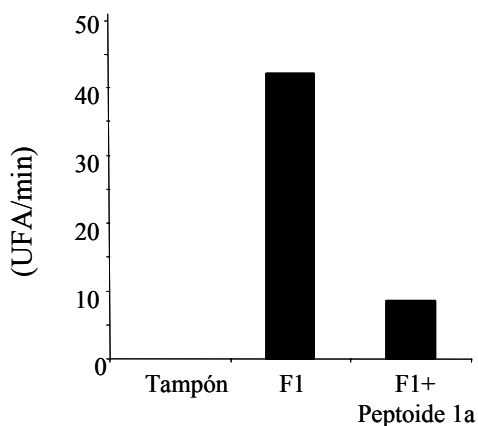


**Figura 55. Análisis de la formación del apoptosoma mediante filtración en gel.** Se llevaron a cabo reacciones de oligomerización de Apaf-1 mediante de adición de Cit c y ATP (ver texto). Una alícuota de las fracciones se utilizó para medir la actividad DEVDasa como control de oligomerización. El resto de las reacciones se resolvieron mediante filtración en gel. (A) y (B) Actividad DEVDasa de las fracciones en las que se utilizó como partida 4 µg de Apaf (fracción 28) y 25 µg de Apaf (purificado en níquel-agarosa) respectivamente.

#### 4.9. Efecto del pseudopéptido 1a sobre Apaf-1 celular

En el fraccionamiento de extractos citoplasmáticos de células 293 se obtiene un extracto llamado F1 en un primer paso de elución salina (Figura 60). El extracto F1 contiene Apaf-1 pero carece de caspasas y de Cit c. Al combinar las fracciones de extracto F1 y FT se puede reconstituir la activación de caspasas mediante el estimulación con ATP, de igual modo que si se tratase de un extracto citoplasmático S-100 (apartado 5.7.2.1.).

La preincubación del extracto F1 con el pseudopéptido 1a durante 15 min a 30 °C y la posterior combinación con FT y ATP mostró inhibición de la activación de caspasas, indicando que las moléculas de Apaf-1 endógeno humanas son inhibibles por el pseudopéptido 1a al igual que las de Apaf-1 recombinante humano expresado en células de insecto y fusionado a una cola de 9 histidinas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 56.



**Figura 56. Activación de caspasas mediante combinación de extractos F1 y FT.** Los extractos F1 se preincubaron 15 min 30 °C, en presencia o ausencia de pseudopéptido 1a 50  $\mu$ M en un volumen de 5  $\mu$ L. Se añadieron 5  $\mu$ L de FT y ATP 1 mM a las reacciones y se incubaron 30 min, 37 °C. El control negativo representa la actividad del extracto FT y ATP en combinación con tampón A y en ausencia de F1. En la gráfica se representa la actividad DEVDasa de las reacciones.

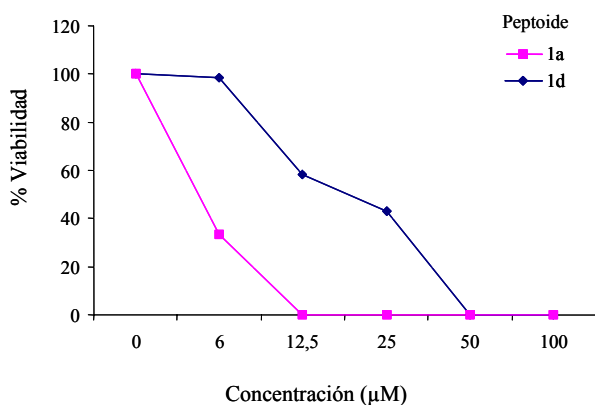
#### 4.10. Ensayos *in vivo*

Con el objetivo de evaluar la actividad de los pseudopéptidos como posibles agentes protectores frente a apoptosis, se abordó un estudio tanto del efecto citotóxico, como de la inhibición de la actividad pro-apoptósica inducida por un agente químico en modelos celulares.

##### 4.10.1. Ensayos de citotoxicidad de los peptoides 1a y 1d

En primer lugar se realizó un análisis de citotoxicidad de los peptoides 1a y 1d. El método escogido para la evaluación de la citotoxicidad de xenobióticos está basado en la cuantificación de la reducción intracelular y utiliza el compuesto Alamar Blue. Alamar Blue puede ser reducido por intermediarios metabólicos (NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN) y al aceptar electrones, cambia de un estado oxidado, azul, no fluorescente, a un estado reducido, rosa y fluorescente (apartado 5.8.1.).

Se sembraron placas de 24 pocillos con 100.000 células U2OS por ml. Se inocularon los peptoides a distintas concentraciones en el medio de cultivo y se midió la fluorescencia a las 24 h de incubación. En la Figura 57 se representa el porcentaje de células viables relativo a la viabilidad de las células no tratadas con peptoide. La citotoxicidad de los peptoides 1a y 1d resultó ser elevada y por tanto incompatibles con estudios *in vivo*.



**Figura 57. Efecto de los pseudopéptidos 1a y 1d sobre la viabilidad celular.** Porcentaje de células viables respecto al control positivo sin tratar en función de la concentración de pseudopéptido añadida al cultivo.

#### 4.10.2 Inducción de apoptosis y ensayo de los peptoides TJa, Cyc, PEN y TAT en células U937

Los pseudopéptidos diseñados para ser utilizados en estudios *in vivo* se ensayaron en un modelo de leucemia humana (Marzo *et al.*, 2004). Se realizó un estudio de la apoptosis inducida por agentes químicos en promonocitos U937 por citometría de flujo utilizando los marcadores Anexina-V-FITC y DiOC<sub>6</sub>. Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Isabel Marzo (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza). La inducción de apoptosis en células U937 se llevó a cabo utilizando doxorrubicina, un compuesto de la familia de las antraciclinas que se utiliza actualmente en clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como leucemias, cáncer de mama o sarcomas. Se ha demostrado que doxorrubicina induce apoptosis en células independiente de Fas y a través de la activación de caspasa 3 (Gamen *et al.*, 1997). Para estudiar el efecto antiapoptótico de los peptoides, las células U937 se estimularon con doxorrubicina 0,5  $\mu\text{M}$  y se incubaron con los pseudopéptidos TJa (5  $\mu\text{M}$ ), TAT (10  $\mu\text{M}$ ), PEN (2,5  $\mu\text{M}$ ) y Cyc (7,5  $\mu\text{M}$ ). Todos los efectos morfológicos y bioquímicos de la doxorrubicina pueden ser neutralizados con el inhibidor de caspasas de amplio espectro Z-VAD-fmk, por lo que se utilizó como control de inhibición de la apoptosis. Se añadió Z-VAD-fmk 100  $\mu\text{M}$  a una parte de los cultivos durante 1 h previo a la incubación de las células con los peptoides. Tras ~18 horas de incubación de las células con los peptoides, la apoptosis se analizó mediante citometría de flujo y se determinaron los cambios en morfología celular, la exposición de fosfatidilserina (PS) en el exterior de la membrana citoplasmática y el potencial de membrana mitocondrial. El efecto inhibitor de caspasas mediante incubación con Z-VAD-fmk también fue analizado de la misma manera. Como se muestra en la Figura 58 A, la doxorrubicina indujo una caída del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ). La incubación con los peptoides o con z-VAD-fmk no influyó en la despolarización de la membrana mitocondrial (Figura 58, A). Además, la inducción de apoptosis con doxorrubicina provocó la exposición de PS en membranas. El inhibidor z-VAD-fmk previno la aparición del pico de PS en membranas. Igualmente, la incubación de los peptoides TJa, PEN, TAT y Cyc resultó en una inhibición de la translocación de PS inducida por doxorrubicina. En algunos casos, como en los casos de células tratadas con los peptoides



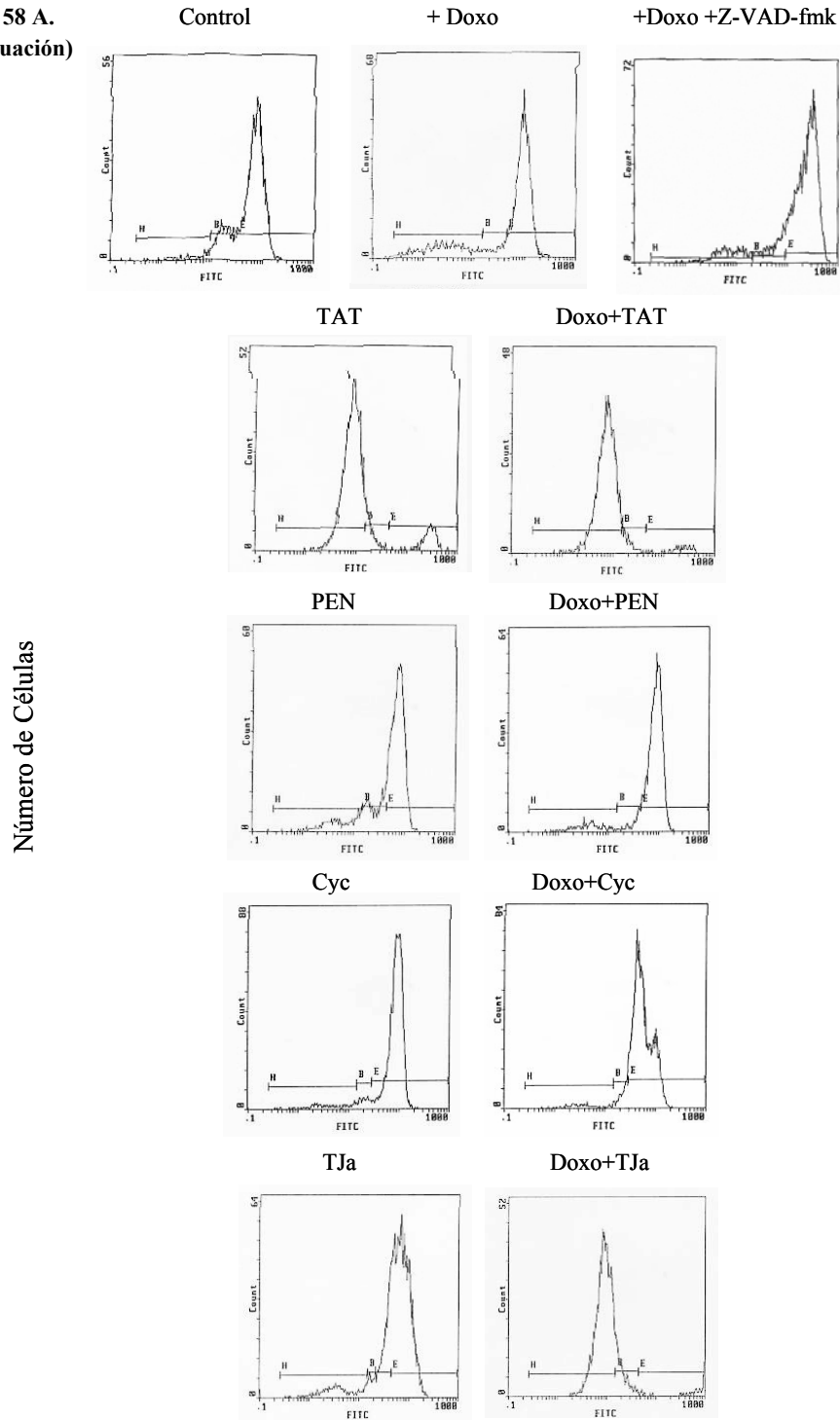
TJa y TAT se observó una inhibición completa de la exposición de PS (Figura 58, B). Además la combinación de los resultados de la tinción con Anexina y la morfología celular analizada mediante dispersión de la luz indican que en los casos de incubación con peptoides PEN y Cyc se produjo además una prevención frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por el tratamiento con doxorubicina. Estos resultados demuestran una protección frente apoptosis mediante el tratamiento con los peptoides derivados del peptoide 1a y además son indicativos de que en la inhibición de la externalización de la PS mediada por los peptoides están implicadas las caspasas.

---

**Figura 58. Estudio de la inhibición de apoptosis inducida por doxorubicina por los peptoides TJa, TAT, PEN y Cyc en células U937.** Las células se cultivaron únicamente con medio de cultivo (control), o con medio conteniendo doxorubicina 1  $\mu\text{M}$ , z-VAD-fmk 100  $\mu\text{M}$ , o peptoides TJa (5  $\mu\text{M}$ ), TAT (10  $\mu\text{M}$ ), PEN (2,5  $\mu\text{M}$ ) y Cyc (7,5  $\mu\text{M}$ ) según se indica. (A) Potencial de membrana mitocondrial (B) Exposición de fosfatidilserina en el exterior de la membrana celular analizado mediante unión a Anexina V-FITC. (C) Dispersión de la luz (*forward scatter*; FS, *side scatter*; SS).

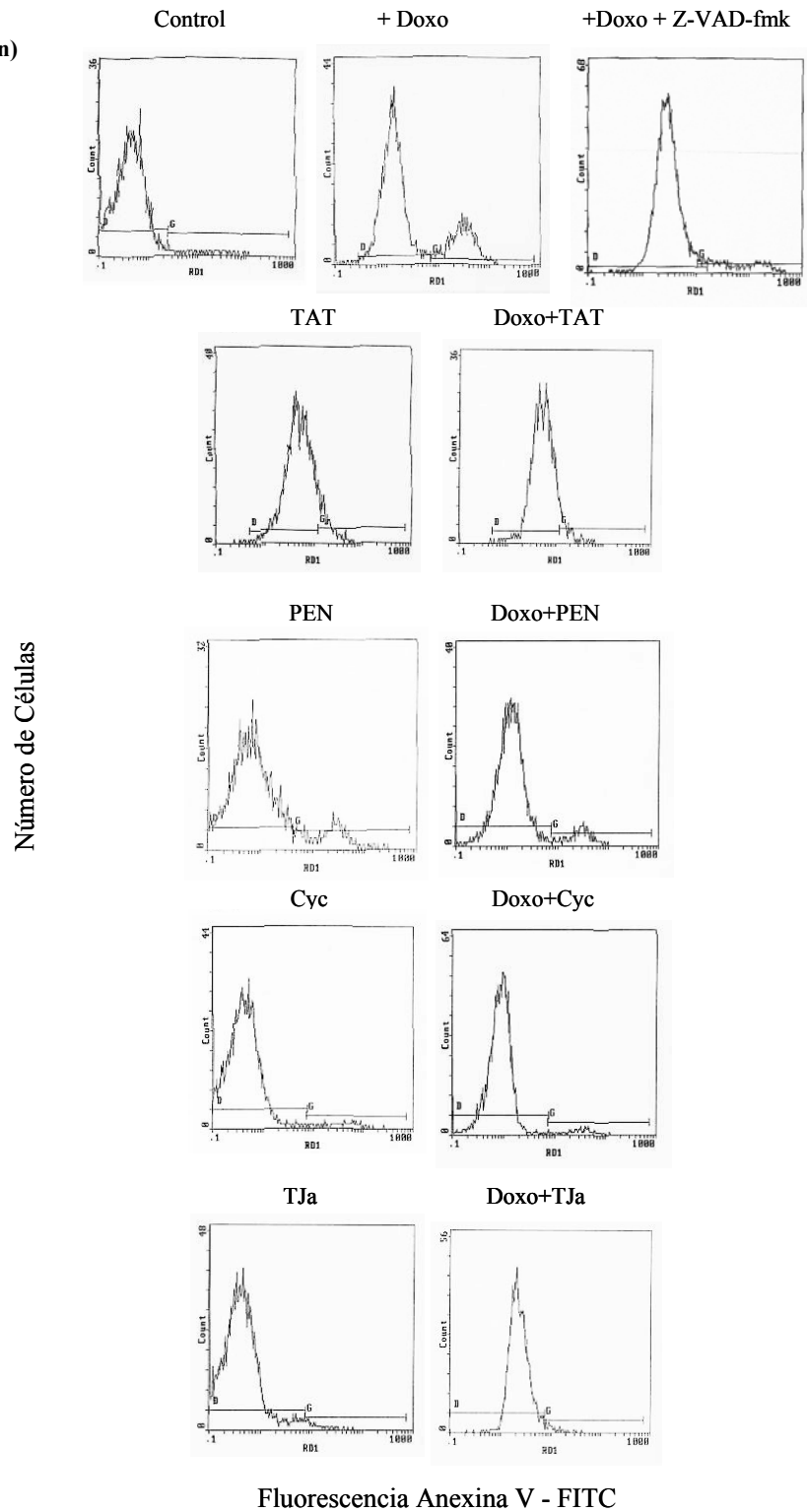
Caracterización Molecular de la Inhibición

Figura 58 A.  
(continuación)



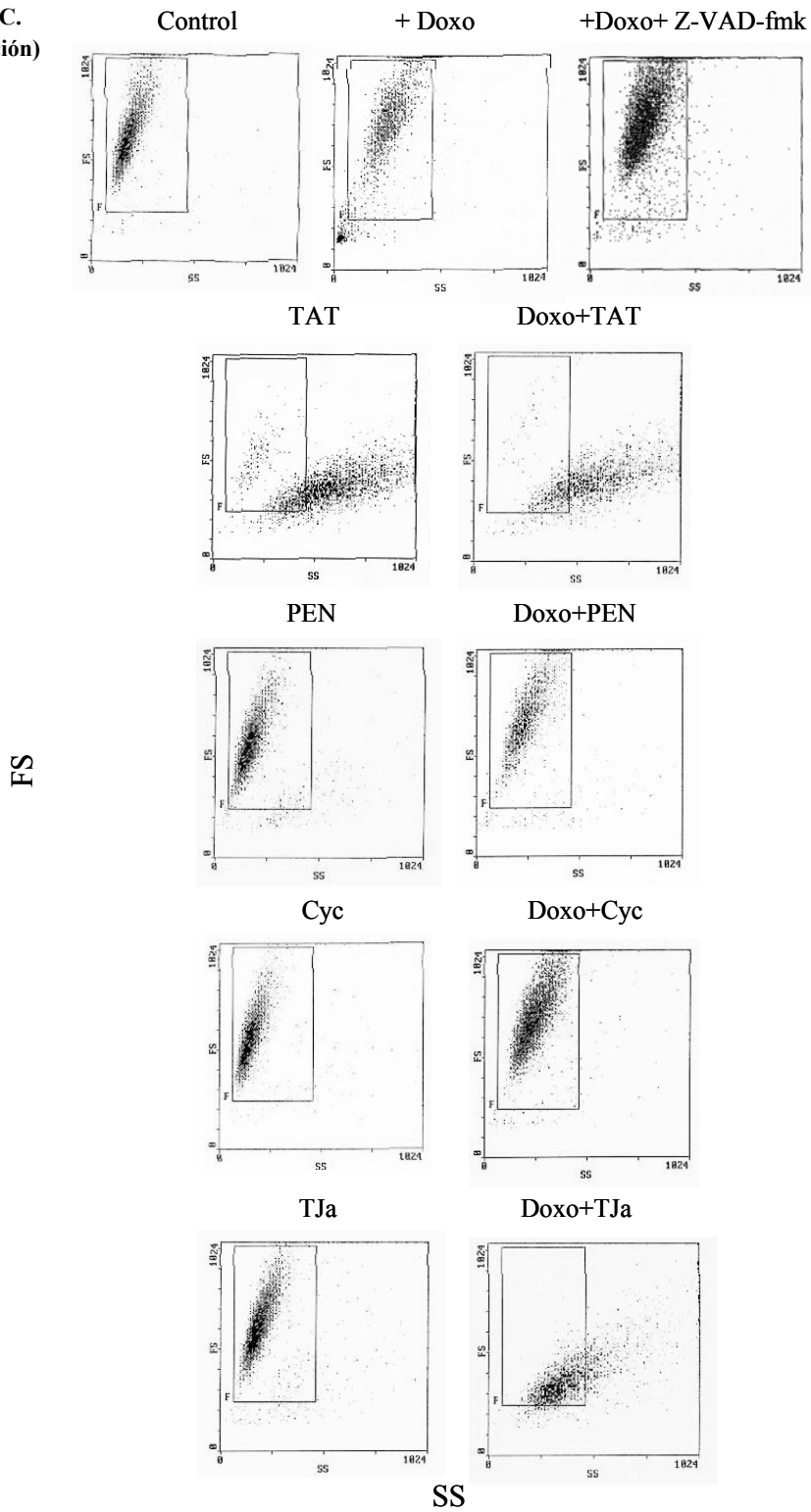
$\Delta$  Fluorescencia  $\Psi$  Potencial de Membrana

Figura 58 B.  
(continuación)



Caracterización Molecular de la Inhibición

Figura 58 C.  
(continuación)



## 5. Materiales y Métodos

---

### 5.1. Manipulación de *Escherichia coli*

#### 5.1.1. Cepas de *E. coli*

La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se utilizó para el aislamiento y manipulación de los plásmidos pFastBac 1, pcDNA3-IceLap6 y pcDNA3-Yama, así como para el almacenamiento en glicerol 15% a -80 °C. Para la manipulación del cDNA de Apaf-1-XL se utilizaron células “*Max Efficiency STBL2<sup>TM</sup>*” (Invitrogen). Las células *E. coli* DH10Bac se utilizaron para la construcción de los bácmidos recombinantes de Apaf-1.

#### 5.1.2. Condiciones de crecimiento

La temperatura de incubación para las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue 37 °C y para las células *E. coli* DH10Bac y *E. coli* STBL2 30 °C. Para el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  se utilizó el medio LB líquido (Luria Bertani) que contiene triptona bacteriológica 1% (p/v) (Pronadisa), extracto de levadura 0,5% (p/v) (Pronadisa), NaCl 1% (p/v) o medio LB sólido, añadiendo 1,5% (p/v) de agar bacteriológico (Pronadisa). Cuando las células de *E. coli* se transformaron con plásmidos se suplementó el medio de cultivo con ampicilina (Roche) a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml, esterilizada por filtración. El medio de cultivo utilizado para la cepa *E. coli* STBL2 fue medio S.O.C. (triptona bacteriológica 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), MgCl<sub>2</sub> 0,25% (p/v), glucosa 20 mM (Pronadisa). Para el paso de transposición del cDNA de Apaf-XL al bácmido las células DH10Bac crecieron en medio LB líquido suplementado con tetraciclina 10  $\mu$ g/ml (Roche), kanamicina 50  $\mu$ g/ml (Roche) y gentamicina 7  $\mu$ g/ml (Invitrogen). Para el aislamiento del DNA bacmídico, el medio LB se suplementó con kanamicina y tetraciclina y para la selección por color de clones positivos se utilizó medio LB sólido suplementado con 100  $\mu$ g/ml Bluo Gal (Invitrogen) o alternativamente X-Gal y 40  $\mu$ g/ml IPTG (Sigma Aldrich) y kanamicina. Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 20

Materiales y métodos

minutos a 1 atm de presión (121 °C).

### **5.1.3. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli***

Para la transformación de las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y STBL2 se prepararon células competentes mediante el método del Cloruro de Rubidio (Current Protocols in Molecular Biology, Jon Wiley & Sons, Inc.). Para la preparación de células competentes de la cepa DH10Bac se utilizó el tratamiento con cationes divalentes descrito en Ausbel *et al.*, (1993). La transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$  con DNA plasmídico se realizó por choque térmico a 42 °C durante 45 segundos de forma convencional siguiendo en protocolo de Hanahan (1983). La transformación de las células *E. coli* DH10Bac y STBL2 se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **5.2. Manipulación de células de insecto**

### **5.2.1. Líneas celulares**

Las líneas celulares utilizadas para producir baculovirus y expresar proteínas recombinantes fueron SF9 y SF21. La línea celular SF9, derivada de las células de ovario de *Spodoptera frugiperda*, fueron de origen comercial (Clontech, “SF9-C”) y además se utilizaron líneas celulares SF9 cedidas por el Dr. Oriol Bach (Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, “SF9-OB”), por la Dra. Maria Luisa Salas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid, “SF9-MLS”) y por el Dr. Howard Fearnhead (National Cancer Institute, Frederick, National Institutes of Health, USA “SF9-HF”). También se utilizaron células de la línea SF21 (Invitrogen), derivadas de la línea celular SF9.

### **5.2.2. Medios y suplementos**

Las células SF21 y SF9 crecieron en medio Grace’s Insect Media suplementado con suero

## Materiales y Métodos

bobino fetal 10% (Invitrogen), yeastsolate 4 g/L (Invitrogen), gentamicina (50 µg/ml), amphotericina b 0,25 µg/ml, (Invitrogen) y para el caso de cultivo en suspensión el medio se suplementó además con el surfactante pluronic F-68 0,1% (Invitrogen). Se utilizó el mismo medio de cultivo como medio de congelación suplementado con DMSO 5% (Sigma).

### **5.2.3. Condiciones de crecimiento y de infección**

Las células SF9 y SF21 crecieron a 27 °C, en ausencia de humedad. Para el caso de crecimiento en agitación orbital las células crecieron en matraces con tapón de rosca para permitir la oxigenación del cultivo, en un volumen máximo correspondiente a un tercio del volumen total del matraz. La velocidad de agitación fue 130 rpm. La densidad celular y la viabilidad del cultivo se siguió a diario contando el número de células con una cámara cuantaglobulos Neubauer y la viabilidad se determinó utilizando Tripán Blue (Invitrogen). La densidad del cultivo osciló desde  $0,2 \cdot 10^6$  cels/ml en el momento de la descongelación hasta una densidad máxima de  $2 \cdot 10^6$  cels/ml en el momento de la infección. En el momento de realizar una infección las células presentaban una viabilidad del 98-100% y el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, es decir, duplicaba su densidad a diario. El cultivo de las células se llevó a cabo en las instalaciones del Servicio de Cultivos Celulares del SCIE (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, Universidad de Valencia).

## **5.3 Manipulación de células de mamífero**

### **5.3.1. Líneas celulares**

Para la generación de extractos celulares se utilizaron células de riñón embrionario humanas 293. Para los estudios de citotoxicidad se utilizaron células de las líneas celulares de osteosarcoma humano U2OS. Los estudios *in vivo* de inducción de apoptosis se realizaron sobre la línea celular promonocítica de leucemia U937.

### **5.3.2. Medios, suplementos**

Las células U2OS y 293 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, Invitrogen) suplementado con 10% suero bovino fetal y 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Las células crecieron en monocapa, a 37 °C, en atmósfera de 10% CO<sub>2</sub>. Las células U937 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bobino fetal, L-glutamina y 100 µg/ml penicilina /estreptomicina.

## **5.4. Manipulación de baculovirus**

### **5.4.1. Construcción de baculovirus recombinantes**

La generación de baculovirus recombinantes conteniendo el gen Apaf-1-XL se llevó a cabo siguiendo el procedimiento Bac-to-Bac (Invitrogen). El cDNA de Apaf-1-XL se subclonó en el plásmido dador pFastBac 1, para transformar células de *E. coli* DH10Bac, conteniendo el genoma completo del baculovirus AcMNPV. En estas células se indujo la transposición dirigida para transferir las secuencias de Apaf-1 al genoma baculoviral. Para que la transposición ocurriese con éxito, fue necesario dejar progresar el tiempo de recuperación tras el choque térmico (tiempo durante el cual ocurre la transposición) durante 10 horas a 37 °C, tiempo superior al recomendado por el fabricante y que ha funcionado para otros genes. Posteriormente se detectaron los baculovirus recombinantes en las colonias transformadas de *E. coli* mediante análisis fenotípicos y genotípicos, empleando medio LB suplementado con kanamicina, el sustrato cromogénico Bluo-gal y el inductor IPTG, para detectar la inserción del báculo con Apaf-1. Las colonias positivas (blancas) se sembraron en medio con ampicilina para eliminar el resto de genoma baculoviral no recombinante. Posteriormente se aisló el genoma desnudo del baculovirus y se encapsuló en liposomas utilizando el lípido CellFectin, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con los liposomas catiónicos se transfectaron células de insecto SF9. Se detectó la presencia de proteína a los tres días de la transfección mediante *Western blot*.



#### 5.4.2. Obtención y amplificación de stocks virales

Los sobrenadantes de cultivos transfectados o infectados se centrifugaron durante 5 min, 500 g, a temperatura ambiente para eliminar restos celulares. Para la producción de un stock viral de trabajo con el que realizar infecciones y obtener proteína, se inocularon 50 µl del sobrenadante resultante de transfectar células SF9 con el báculo recombinante de Apaf-1 (con un título de  $\sim 5.10^7$  ufp/ml) en placas de 12 cm conteniendo una monocapa de células a una densidad celular de  $1.10^6$  cels/ml. Se incubó durante 1 hora el medio conteniendo los virus, tras lo cual se lavó este medio con tampón PBS (NaCl 0,8% (p/v), KCl 0,02% (p/v),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM) para eliminar los virus defectivos que no se hubiesen internalizado. A los tres días de la inoculación se recuperaron los sobrenadantes de aquellas placas cuyas células mostraban signos de citopaticidad (Figura 14) y se centrifugaron a 500 g, 5 min. En un segundo paso de infección se utilizó este caldo viral para amplificar el “stock” y obtener un stock viral de trabajo. Esta segunda infección se realizó en cultivo en suspensión inoculando cultivos de 300 ml de células SF9 ó SF21 a  $2.10^6$  cels/ml, con 1-3 ml del caldo viral anterior. Las infecciones para generar stock viral se realizaron por a una multiplicidad de infección baja, de 0,1 (ufp/cel) o menor. Los stocks virales de trabajo se mantuvieron a 4 °C protegidos de la luz durante semanas o meses. Alícuotas de los stocks se congelaron y almacenaron a – 80 °C.

#### 5.4.3. Titulación de stocks virales

El título de los “stocks” virales se cuantificó mediante un ensayo en placa y detección de los virus con anticuerpos específicos utilizando el kit *BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit* (Clontech) siguiendo el protocolo que se muestra en la Figura 59. Se inocularon monocapas de células previamente sembradas en pocillos, con diluciones seriadas del stock. Se practicaron infecciones con las diluciones, dejándolas progresar 1 hora. Se eliminaron los virus no internalizados retirando el medio, tras lo cual el pocillo se cubrió con una capa de metil-agarosa. A las 45 horas de la infección los focos infecciosos se determinaron mediante un inmunoensayo, que utiliza un anticuerpo dirigido contra la proteína gp64 de la pared del virus, el cual es reconocido por un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Un sustrato cromogénico de

## Materiales y métodos

peroxidasa reveló núcleos de color azul en las monocapas ensayadas y su número se cuantificó utilizando un microscopio óptico.

**Figura 59. Cuantificación del título de un “stock” de baculovirus mediante inmunoensayo.**

Título viral (ufp/mL) =  $n^{\circ}$  promedio de focos por pocillo x factor de dilución x R

R es un factor de corrección empírico inherente al ensayo (Kitts y Green, 1999).

### 5.5. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos

#### 5.5.1. Purificación de plásmidos de *E. coli*

Para la obtención de plásmidos a pequeña escala se utilizaron los kits *High Pure Plasmid Isolation Kit* y *QIAprep Spin Miniprep Kit* de las casas comerciales Roche y Qiagen respectivamente.

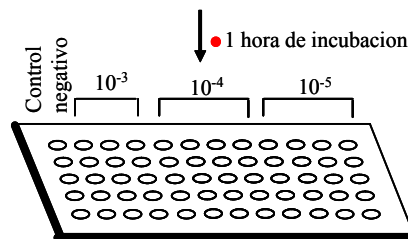
#### 5.5.2. Subclonado del DNA que codifica para la proteína Apaf-1-XL

##### 5.5.2.1. Diseño de la construcción

El cDNA que codifica para Apaf-1-XL cedido por el Dr. Gabriel Nuñez (Comprehensive Cancer Center, Ann Arbor, University of Michigan, USA), se subclonó desde el plásmido pCDNA3 en el vector lanzadera de baculovirus pFastBac 1 y el proceso que se siguió fue el siguiente:

- (i) Se amplificó el cDNA que codifica a Apaf-1-XL por PCR.

- Siembra de pocillos en placa de 96 con células SF9 ó SF21 en estado de fase exponencial temprana



- 1 hora de incubacion con diluciones seriadas del stock viral (infeccion)
- Eliminacion del inoculo viral (lavado)
- Cubrir con una capa de metil celulosa
- 42 horas de incubacion

Inmunoensayo

Contaje del número de núcleos de infección azules

- (ii) El producto de PCR se purificó utilizando columnas *High Pure PCR Product Purification Kit* (Boehringer Mannheim).
- (iii) El plásmido pFastBac 1 y el producto de PCR se linearizaron con las enzimas XhoI y BamHI. Primero se digirieron con un enzima, se realizó una precipitación del DNA con acetato de sodio y etanol y después se digirió el DNA con la segunda enzima. Ambos fragmentos se purificaron mediante electroforesis preparativa utilizando agarosa de bajo punto de fusión.
- iv) Se llevaron a cabo reacciones de ligación y se transformaron células STBL2 con el producto de la ligación. A continuación se describen las técnicas utilizadas en cada uno de estos procesos.

#### 5.5.2.2. Reacciones de PCR

Para la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del cDNA que codifica Apaf-XL se diseñaron dos oligonucleótidos que permitiesen subclonar el cDNA de Apaf-1 como proteína de fusión a una cola de 9 histidinas C-terminal (Isogen):

Oligo Bam-Apaf 5' CGA CTA GGA TTC ATG GAT GCA AAA GCT GC 3'

Oligo Apaf-C9h 5' GCA CTA CTC GAG TTA ATG GTG ATG ATG GTG ATG GTG  
GTG ATG TTC TAA AGT CTG TAA AAT ATA TAA AAT ACC 3'

Los oligos Bam-Apaf y Apaf-C9h contienen en su extremo 5' las secuencias diana de los enzimas de restricción Bam HI y Xho I, respectivamente, seleccionadas para su posterior clonación. El oligo Apaf-C9h contiene además la secuencia que codifica para una cola de 9 histidinas y un codón de terminación. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler personal*. La mezcla de reacción contenía 1 ng de DNA molde (pcDNA3-Apaf-1-XL), dNTPs 1 mM, tampón comercial 1X con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1,5 unidades de Taq polimerasa (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche) y oligonucleótidos cebadores 0,5 μM, en un volumen final de 50 μL. Tras una reacción de desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, se efectuaron 30 ciclos de amplificación (94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 74 °C 7 min) y una extensión final de 10 min a 74 °C.

### 5.5.2.3. Secuenciación del DNA

La secuenciación completa del cDNA de Apaf-1-XL subclonado en pFastBac 1 se analizó en el Servicio de Secuenciación de DNA del SCIE, Universidad de Valencia. Para la secuenciación se utilizaron oligos basados en la secuencia publicada del gen de Apaf-1-XL (pubmed AF149794). La secuencia completa correcta se confirmó en uno de los clones analizados, con el que se continuó el procedimiento de construcción de baculovirus recombinantes de Apaf-1.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del plásmido Apaf-1-XL-pFastBac 1.

PFastUpSeq	5'-TAA GTA TTT TAC TGT TTT CG-3'
Apaf 725r	5'-CAG CAT AGC TGC TCT TTG C-3'
Apaf 564	5'-GCA TTG GGT TTC AGT TGG G-3'
Apaf 1282	5'-GGA CTC TTG GGT GTT GAA AGC-3'
Apaf 1940	5'-GGT GTT CAA AGC TGA AAC AGG-3'
Apaf 2005	5'-GGC CTA TCA CAT GGC CAG TGC-3'
Apaf 2770	5'-CTC TGC TGT AAT GTT AAA GC-3'
Apaf 2710	5'-CTG CTT CCT CAA ACT TTG GG-3'
Apaf 3435	5'-GGC ACA TCC AGT TCA CAG CCG-3'
PFast-Cterm	5'-GGT TCA GGG GGA GGT GTG GG-3'
Apaf C9 his	5'-GCA CTA CTC GAG TTA ATG GTG ATG ATG GTG ATG GTG GTG ATG TTC TAA AGT CTG TAA AAT ATA TAA AAT ACC-3'

### 5.5.3. Otras reacciones enzimáticas

Para la digestión del DNA se utilizaron enzimas de restricción de Boehringer Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante. La banda del vector pfastBac 1 linearizado, obtenida mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (apartado 5.5.4.), se fundió a 65 °C, 5 min y se trató con 2 µl de enzima agarasa (AgarACE, Promega).

#### 5.5.4. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos

Las electroforesis de DNA se llevaron a cabo en el sistema de Minigeles (*Mini Sub Cell* GT, Bio-Rad), utilizando geles de agarosa (Sigma Aldrich) al 1% en tampón TAE (Tris acetato 40 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM, pH 8.5), con 10 mg/ml de Bromuro de etidio (Sigma Aldrich), a 90 voltios durante aproximadamente 40 min.

Para la obtención de fragmentos de DNA mediante electroforesis preparativa se utilizó agarosa de bajo punto de fusión Agarosa LM-2 (Pronadisa), el kit de purificación de fragmentos *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y la enzima AgarACE.

El análisis del DNA bacmídico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,5% conteniendo bromuro de etidio 0,5 g/ml y en tampón TAE. La electroforesis se realizó a un voltaje constante 23 V durante 12 horas.

#### 5.5.5. Purificación de DNA viral, PCR y secuenciación

Para aislar el DNA bacmídico a partir de *E. coli* DH10Bac, se siguió un protocolo desarrollado para aislar plasmidos de alto peso molecular (<100 Kb) (Frengen *et al.*, 1997). El DNA aislado se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, se identificaron las bandas correspondientes al bádico por comparación con el patrón de pesos moleculares y se seccionaron para su posterior análisis mediante PCR. Para la amplificación del DNA se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

M13 /pUC forward 5'- CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC G -3'

M13 /pUC reverse 5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG -3'

Para la mezcla de reacción se utilizó 1 µl (~ 1 ng DNA) de la banda seccionada conteniendo el bádico como molde, dNTPs 1 mM, tampón comercial 1X con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1,5 unidades de Taq polimerasa (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche), oligonucleótidos cebadores 0,5 µM, en un volumen final de 50 µL. El programa utilizado fue: 3 min de desnaturalización inicial a 93 °C, 25 ciclos de amplificación (94 °C 45 s, 55 °C 45 s 72 °C, 5 min) y una extensión final

## Materiales y métodos

de 10 min a 72 °C. La secuenciación del DNA bacmídico conteniendo el gen de Apaf-1, se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del SCIE (Universidad de Valencia) utilizando oligonucleótidos que se describe en la Tabla 4, apartado 5.5.2.3. El aislamiento de DNA viral a partir del medio de cultivos infectados se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en O'Reilly (1992).

### 5.6. Aislamiento y manipulación de proteínas

#### 5.6.1. Obtención y análisis de proteínas recombinantes

##### 5.6.1.1. Expresión de Apaf-1 en células de insecto

Para la obtención de Apaf-1 recombinante, 300 ml de células SF9 creciendo a una densidad celular de  $2 \cdot 10^6$  cels/ml, se infectaron con un inóculo correspondiente a una MDI entre 1 y 3, es decir 3 - 9 ml de stock de título  $2 \cdot 10^8$  pfu /ml. A las 40 h de infección las células se centrifugaron a 1000 rpm, 5 min a 4 °C. Las células se lavaron en medio PBS frío y se resuspendieron en 2,5 volúmenes de tampón de lisis (Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico)- KOH 20 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaEDTA 1 mM, EGTA (ácido etilenebis(oxonitrilo)tetraacético) 1 mM, DTT 0,1 mM y una pastilla de Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) por cada 10 ml de tampón ó alternativamente 2 µg/ml de leupeptina, quimostatina y antipaina). La lisis se realizó de forma mecánica utilizando un douncer con émbolo tipo B (Wheaton) y mediante 10-12 golpes de lisis.

##### 5.6.1.2. Purificación de Apaf-1

El lisado de células de insecto (apartado 5.6.1.1.) se inyectó en una columna conteniendo 300 µl de la resina *Ni-NTA Agarose*, (Qiagen) y se lavó con 40 ml de tampón de lavado (Hepes-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaEDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0,1 mM, PMSF 0,1 mM, NaCl 1 M, imidazol 25 mM). La proteína eluyó en 600 µl de tampón de elución (Hepes-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaEDTA 1 mM, EGTA 1

## Materiales y Métodos

mM, DTT 0,1 mM, PMSF 0,1 mM, imidazol 250 mM). Se utilizaron columnas Y-M10 (Millipore) para concentrar la proteína y eliminar el imidazol. La proteína purificada se almacenó en alícuotas en tampón A (Hepes-KOH 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaEDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0,1 mM, PMSF 0,1 mM) 20% glicerol, a -80 °C o alternativamente se sometió a un segundo paso de purificación. El segundo paso de purificación de Apaf-1 se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel utilizando un equipo Akta Prime System y una columna Superose 6 High Resolution (Amersham Pharmacia Biotech). La proteína eluyó a 4 °C, en tampón (NaCl 50 mM, Hepes 20 mM pH 7,0, Chaps 0,1%, sacarosa 5%, DTT 5 mM), con un flujo de 0,5 ml/min. Se recogieron 40 fracciones de 0,5 ml. La identidad de la proteína se determinó mediante *Western blot*.

La cuantificación de Apaf-1 se llevó a cabo mediante ensayo colorimétrico utilizando el *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). Para realizar una curva patrón se utilizó BSA (*Protein Assay Standard Set* 2mg/ml BSA ampules, Pierce)

### 5.6.1.3. Expresión *in vitro* de procaspasas 9 y 3

Para la expresión *in vitro* de PC9 y PC3 se partió de los plásmidos pcDNA3-IceLap6-FLAG y pcDNA3-Yama, cedidos por el Dr. Vishva Dixit (Department of Pathology, University of Michigan, Medical School, USA). Para la expresión *in vitro* de las proteínas PC9 y PC3 se utilizó 1 µg de las construcciones: pcDNA3-IceLap6-FLAG ó pcDNA3-Yama respectivamente y se empleó el kit *TNT-T7 Quick coupled Transcription-Translation System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite expresar proteínas bajo el control del promotor de la RNA polimerasa de T7. Para el marcaje de las proteínas se utilizó un aminoácido marcado L-(<sup>35</sup>S-Metionina) (Amersham Pharmacia Biotech). La síntesis de <sup>35</sup>S-PC9 y <sup>35</sup>S-PC3, se comprobó mediante SDS-PAGE, obteniendo únicamente una banda correspondiente a cada caspasa de tamaño molecular correcto. La síntesis de PC9 no marcada radiactivamente utilizando este sistema se realizó en presencia del aminoácido metionina provisto por el kit. El exceso de nucleótidos marcados, sales etc. en los productos de transcripción/traducción, se eliminaron utilizando columnas Ultrafree 10 K (Millipore) y se

utilizaron en reacciones de reconstitución de apoptosomas. El plásmido correspondiente al mutante de PC9 Cys 287 →Ser (PC9 NH) fue proporcionado por el Dr. Howard O.Fearnhead y la síntesis de PC9NH se realizó mediante el mismo procedimiento descrito para PC9 salvaje.

### 5.6.2. Electroforesis y análisis *Western blot*

Los extractos de proteínas o las proteínas purificadas se disolvieron en el tampón de muestras de SDS (Tris-HCl 63 mM pH 6,8, SDS 10% (v/v), Azul de bromofenol 0,025% (p/v), 0,5 M DTT). Las proteínas procedentes de ensayos de reconstitución de apoptosoma se resolvieron en geles de 16% poliacrilamida en presencia de SDS, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970) y utilizando un sistema de minigeles (Miniprotean® Electroforesis cell, Bio-Rad) en tampón de composición: Tris 6 g/L, glicina 28,8 g/L y SDS 1 g/L. Las electroforesis se realizaron a una intensidad constante de 16 mA. Los geles se tiñeron con azul Coomassie y en ocasiones con plata utilizando el Silver Stain Plus kit (Bio-Rad). Para el análisis de la proteína Apaf-1 pura se utilizaron geles de porcentaje entre 8 y 10%.

En el análisis mediante *Western blot* las proteínas de los geles se electrotransferieron a membrana de nitrocelulosa (Millipore) utilizando tampón de transferencia (metanol 20% (v/v), glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v), Tris-HCl 25 mM pH 8,3). La transferencia se llevó a cabo en el sistema *Trans-blot* (Bio Rad). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM) con 5% de leche en polvo desnatada (TBSL) durante una hora. El anticuerpo anti Apaf-1 policlonal dirigido contra su fragmento N-terminal (Pharmingen), se utilizó rutinariamente a una dilución 1:5000 en TBS (leche 0,5%, BSA 1%). Las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario y se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBST (TBS tween-20 0,1% (v/v)). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron de cabra anticonejo conjugados con peroxidasa (dilución 1:2000) (Bio-Rad), o conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1:5000) (Bio-Rad), ambos fueron diluidos en TBS (leche 0,5%, BSA 1%). Los lavados se realizaron en TBST. El revelado se siguió en cada caso siguiendo las instrucciones del fabricante, para revelado con bioluminiscencia (ECL) y en el caso del anticuerpo unido a fosfatasa alcalina se utilizaron como sustratos NBT y BCIP. Este anticuerpo se utilizó en la caracterización de la cinética de expresión de Apaf-1. Para el análisis



por *Western blot* de la región C-terminal de Apaf-1 se utilizó el anticuerpo anti Apaf-1 producido en pollo. Este anticuerpo policlonal está dirigido contra los aminoácidos 570-1249 de Apaf-1. La incubación con el anticuerpo se realizó a una dilución de 1:500 durante toda la noche y se utilizó anticuerpo secundario anti-pollo. Ambos anticuerpos fueron cedidos por el Dr. Fearnhead (Apoptosis Section, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, USA). Para el análisis de las fracciones resultantes de experimentos de filtración en gel se utilizó un anticuerpo anti-Apaf-1 monoclonal (Alexis 18H2) dirigido contra el dominio N-terminal CARD de Apaf-1 (aminoácidos 1-97).

### 5.6.3. Ensayos de *pull-down*

Para los ensayos de *pull-down* se utilizó el mutante no hidrolizable de PC9 (PC9 NH): Cys 287 → Ser (Fearnhead, 1997). La proteína PC9 NH se obtuvo mediante transcripción/traducción *in vitro* y se marcó radiactivamente mediante el mismo procedimiento que PC9 salvaje (apartado 5.6.1.3.). 250 ng de Apaf-1 recombinante se incubaron con el pseudopéptido 1a en tampón A durante 30 min, 30 °C, en un volumen total de reacción de 20 µl. Tras este tiempo se añadieron 1 mM ATP, 1 µM Cit c y 5 µl de <sup>35</sup>S-PC9 NH y la reacción se dejó progresar 30 min a 37 °C. La actividad de las reacciones se analizó tomando 1 µl de las mismas y sometiendo a ensayo de activación de caspasas en extractos (apartado 5.7.2.). El resto del volumen de reacción se diluyó 1/10 en tampón A a 4 °C y se mezclaron con 20 µl de bolas de níquel agarosa (Qiagen). Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 4 °C y se lavaron tres veces con tampón A a 4 °C. Los complejos se resolvieron en geles de SDS-PAGE 10% y se detectó la presencia de <sup>35</sup>S-PC9 NH mediante autorradiografía.

## 5.7. Ensayos de Apoptosis

Los ensayos de apoptosis *in vitro* que miden actividad caspasa pueden dividirse en dos grupos: los que utilizan sustratos de caspasas, o bien el procesamiento de caspasas como indicador de activación. En el presente trabajo se abordaron las dos aproximaciones y se describen en los apartados 5.7.1. y 5.7.2.

### **5.7.1. Ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro***

Para la incubación de los componentes del apoptosoma se utilizaron 100-200 ng de Apaf-1 purificado mediante cromatografía de intercambio iónico (níquel agarosa), 30 ng de Cit c de corazón de caballo comercial (Sigma), 3 µl de procaspasa 9 transcrita y traducida *in vitro* (apartado 5.6.1.3.), en tampón A suplementado con dATP 0,1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM. El volumen total de las reacciones fue de 20 µl. En los casos en los que se analizó el procesamiento de PC3 se añadió PC9 no marcada y PC3 marcada radiactivamente en un volumen final de 23 µl. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 30 °C, tras lo cual se pararon mediante adición de 5 µl de tampón SDS 5X. Las reacciones se resolvieron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS 16% y se fijaron en una solución orgánica (metanol 20%, ácido acético 5%) durante 30 min. Los geles se secaron en un secador de geles, SG4050 *Slab Gel dryer* (Thermosavant) y se expusieron en una pantalla intensificadora Bas-IP MP 2050 (Fujifilm). El análisis por autorradiografía se llevó a cabo utilizando un fosforimager FLA-300 (Fujifilm) y se procesaron las imágenes con los programas *Image Gauge v3.12* e *Image Reader v.1.0* (FujiPhotoFilm). Las bandas se densitometraron, utilizando el programa de análisis de imagen *Quantity One* (Bio-Rad).

Para la cuantificación de las alícuotas de Cit c se realizó un espectro entre 350 y 600 nm y se midió su absorbancia en el punto isóbstico A<sub>409,5</sub>.

### **5.7.2. Ensayos de detección del procesamiento de caspasas *in vitro* utilizando extractos libres de células**

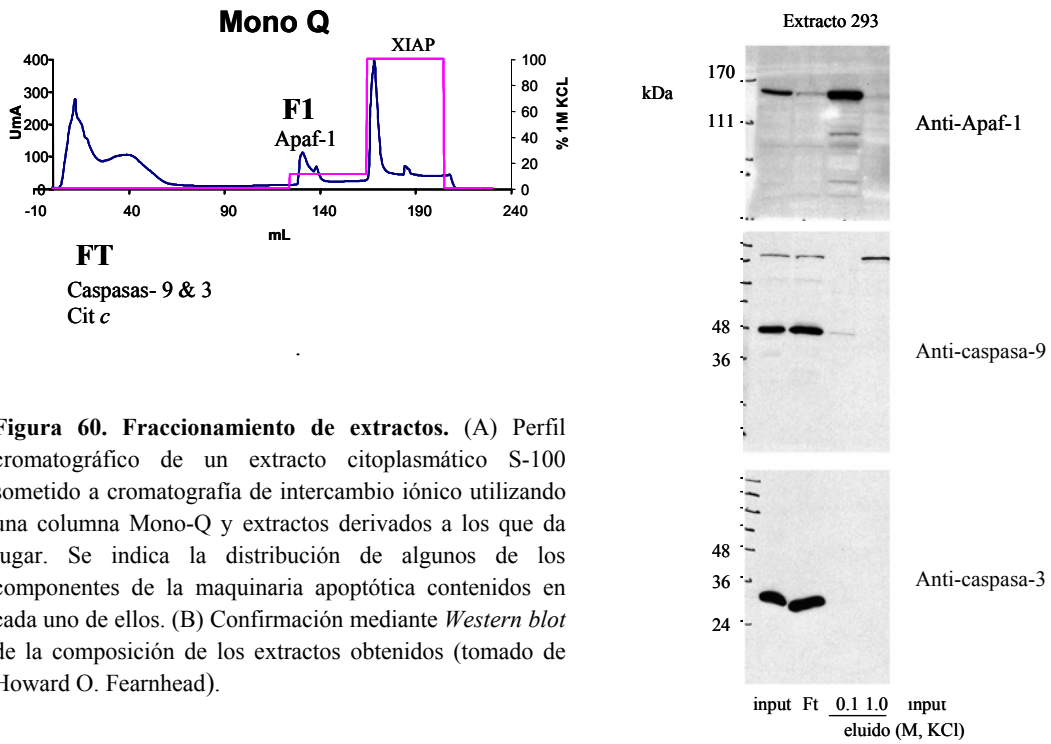
Para la cuantificación de la actividad caspasa se recurrió a un ensayo proteasa, que utiliza extractos celulares y el sustrato fluorogénico de caspasa 3 Ac-DEVD-afc (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) (Biomol). Este sustrato se basa en el sitio de corte de PC3 sobre su sustrato natural PARP (poli(ADP-ribosa)polimerasa). Se utilizaron extractos celulares citoplasmáticos derivados de extractos S-100, producidos en el laboratorio del Dr. Howard O. Fearnhead a partir de células 293 cultivadas en monocapa. Este ensayo permite el análisis rápido y simultáneo de un gran número de muestras (Fearnhead, 2001).

### 5.7.2.1. Preparación y fraccionamiento de extractos celulares

Para la preparación de extractos citoplasmáticos S-100 se utilizaron células 293. Las células se tripsinizaron, se lavaron en tampón PBS y se resuspendieron en 10 ml de tampón de extracto (PIPES (ácido 1,4-piperacindietanosulfónico) 50 mM pH 7,0, KCl 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, pepstatina A 2 µg/ml, quimostatina 2 µg/ml, antipaina 2 µg/ml, citocalasina B 2 µg/ml, PMSF 100 µM). Seguidamente las células se centrifugaron a 500 rpm, 5 min y se retiró el sobrenadante. Las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación y se centrifugaron a 100.000 g, 60 min. El contenido en proteína del extracto se cuantificó, obteniéndose valores de alrededor de 30 mg de proteína por cada ml de extracto (Fearhead, 1997).

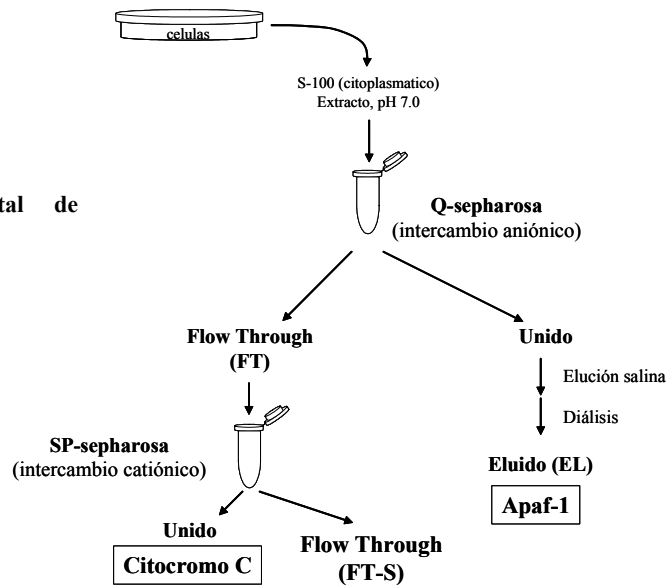
Los extractos citoplasmáticos S-100 se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio iónico, para obtener extractos que contenían determinados componentes de la maquinaria apoptótica y carecían de otros (Figuras 60, 61). Así, en el volumen vacío de una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Mono Q, se obtuvo un extracto llamado FT (“flow through”, o también llamado FT-Q en alusión a la columna Mono Q) que contenía las caspasas 3 y 9 y Cit c, pero que carecía de Apaf-1. En un primer paso de elución salina se obtuvo un extracto llamado F1, que contenía Apaf-1 pero no caspasas o Cit c. Estos dos extractos, FT y F1, carecían de actividad caspasa por separado, pero al combinarlos se reconstituía la actividad igual que para el caso del extracto total S-100. La validación de los extractos se realizó mediante *Western blot* y ensayo proteasa utilizando Ac-DEVD-afc.

Los extractos vaciados de Cit c, FT-S, se producen a partir de la fracción de extracto FT mediante tres rondas de incubación con 0,25 volúmenes de SP-Sepharosa (Amersham Pharmacia) de dos horas de duración a 4 °C. Tras la incubación, el extracto se centrifugó 100g, 5 min, 4 °C. La eliminación de Cit c de los extractos se confirmó mediante *Western blot* y ensayo de activación de caspasas, en los que se comprobó el requerimiento de adición de Cit c externa.



**Figura 60. Fraccionamiento de extractos.** (A) Perfil cromatográfico de un extracto citoplasmático S-100 sometido a cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Mono-Q y extractos derivados a los que da lugar. Se indica la distribución de algunos de los componentes de la maquinaria apoptótica contenidos en cada uno de ellos. (B) Confirmación mediante *Western blot* de la composición de los extractos obtenidos (tomado de Howard O. Fearnhead).

**Figura 61. Esquema experimental de producción de los distintos extractos.**



### **5.7.2.2. Ensayo fluorométrico**

Los extractos FT son extractos activables por ATP o dATP. En ellos las caspasas permanecen inactivas en forma zimógeno hasta recibir el estímulo activador. Los ensayos de activación de caspasas en extractos libres de Apaf-1 (FT) se realizaron por complementación mediante adición Apaf-1 recombinante. La valoración de la actividad caspasa 3 se llevó a cabo incubando 5  $\mu$ l del extracto celular FT con ATP ó dATP 1 mM a 37 °C durante 30-60 min. Tras la incubación se determinó la actividad caspasa mezclando 3 $\mu$ l de reacción con 100  $\mu$ l de tampón de ensayo (PBS, glicerol 10%, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM y Ac-DEVD-afc 20  $\mu$ M). La medida de afc libre se realizó siguiendo el cambio de la fluorescencia excitando a 400 nm y midiendo a 508 nm.

Las medidas se realizaron a 30 °C utilizando un fluorímetro lector de placas Cytofluor 4000 (Perspectiva Biosystems). Las medidas se realizaron por triplicado aplicando 3  $\mu$ l de muestra a 3 pocillos de la placa y el lector de placas se programó para realizar medidas continuas cada 60 s. La tasa de formación de afc se utilizó para calcular la actividad caspasa 3 en el extracto, como pmoles de afc generados por minuto y por miligramo de proteína de extracto total a 30 °C (pmol/min/mg) y expresada como unidades arbitrarias de fluorescencia generadas por minuto (UFA/min).

## **5.8. Ensayos *in vivo***

### **5.8.1. Estudios de citotoxicidad**

El método escogido para la evaluación de la citotoxicidad de xenobióticos está basado en la cuantificación de la reducción intracelular y utiliza el compuesto Alamar Blue. Alamar Blue es un compuesto soluble y estable en los medios de cultivo celular, no tóxico y que no altera la viabilidad celular. La actividad metabólica de las células cesa cuando se añade un compuesto tóxico a las células. Las razones de los intermediarios metabólicos como NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN aumentan durante la proliferación. Alamar Blue puede ser reducido por estos intermediarios metabólicos. La reducción se acompaña por un cambio de color y de las

## Materiales y métodos

propiedades fluorescentes. Al aceptar electrones, cambia de un estado oxidado, azul, no fluorescente, a un estado reducido, rosa y fluorescente. La medida se realizó cuantificando la fluorescencia. La excitación se produjo a 530 nm y la emisión se cuantificó a 580 nm.

Para los estudios de citotoxicidad se sembraron 100.000 células U2-OS por pocillo en placas de 12 pocillos. Las células se incubaron con 6 diluciones seriadas de los compuestos en estudio, en dos series por duplicado. A las 24 horas se añadieron 20  $\mu$ l de Alamar Blue a los pocillos y se analizó la fluorescencia.

### 5.8.2. Inducción de apoptosis y análisis mediante citometría de flujo

Tras la inducción química de la apoptosis en células U937, mediante citometría de flujo se midieron la exposición de PS en membranas, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la morfología celular. Se midieron los dos factores de dispersión de la luz FSC (“forward light scatter”), que es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión y la luz dispersada en ángulo recto (SS; “side scatter”), proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula (la granulosidad del interior celular).

Los restos de fosfatidilserina (PS) se encuentran en el lado citosólico de las células vivas y durante la apoptosis pasan de la cara interna a la cara externa de la membrana citoplasmática. La PS puede ser detectada al incubar las células con Annexina V marcada con fluoresceína. De este modo la diferencia en la intensidad de la fluorescencia de los complejos constituye un indicador de apoptosis. Asimismo se evaluó el daño mitocondrial por tinción con DiOC<sub>6</sub>, un fluorocromo catiónico lipofílico es sensible al potencial de membrana

Se indujo apoptosis en células U937 mediante adición de doxorubicina 0,5  $\mu$ M al medio de cultivo. A los 30 min se añadieron los peptoides: TAT (10  $\mu$ M), PEN (2,5  $\mu$ M), TJa (5  $\mu$ M), y Cyc (7,5  $\mu$ M). Tras ~18 horas de incubación (toda la noche) la apoptosis se analizó en las células, mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro EPICS-XL (Coulter). El análisis se realizó mediante determinación de los cambios en la dispersión de la luz (“*forward/side scatter*”) y determinación simultánea de la exposición de PS y el  $\Delta\Psi_m$  con annexina V-PE (Caltag) y DiOC<sub>6</sub>(3) (Molecular Probes), respectivamente. Las células se incubaron con DiOC<sub>6</sub>(3) 5nM en 200  $\mu$ L en tampón de unión (Hepes-NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub>

2,5 mM) a 37 °C durante 15 min. Tras este tiempo se añadió a las células 1 µL de anexina V-PE (0,1 µg/mL) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron hasta 1 mL con tampón de unión y se analizaron mediante citometría de flujo.

### 5.9. Ensayos de polarización de la fluorescencia

Para estudiar la interacción entre Apaf-1 y el peptoide 1a se sintetizó una versión fluorescente del peptoide 1a unido a 5'-6' carboxifluoresceína ( $\epsilon = 83.000$ ): peptoide 1a fl. Los experimentos de polarización de la fluorescencia se realizaron utilizando un fluorímetro Victor<sup>2</sup> V 1420 Multilabel HTS Counter. Se realizaron diluciones seriadas de Apaf-1 entre 6 y 600 nM que se incorporaron a disoluciones de peptoide fluorescente 60 nM en un volumen total de 200 µl. Las medidas se realizaron en placas oscuras de 96 pocillos Opti-plate (Perkin Elmer). La placa se incubó en el aparato durante 30 min, a 30 °C, tras lo cual se realizó la medida y se grabaron los datos utilizando el software para windows Wallac 1420 Workstation. La profundidad de medida fue de 15 mm, el factor de corrección del aparato fue  $G = 1,2$  y el tiempo de medida 0,1 s. El peptoide fluorescente se excitó a 480 nm y la emisión se monitorizó a 535 nm. Los valores de milipolarización (mP) obtenidos corresponden a la fórmula:

$$mP = \frac{1000 (// - G * \perp)}{// + G * \perp}$$

donde // y  $\perp$  hacen referencia a la intensidad de la fluorescencia emitidas en sentido paralelo y perpendicular al haz de luz con que se excita la muestra. G es la constante del aparato y tiene un valor de 1,2.

La titulación de Cit c, aldolasa, catalasa, ribonucleasa A y el dominio de tetramerización de p53, mas el peptoide fluorescente se realizaron en las mismas condiciones que para el caso de Apaf-1.

### **5.10. Estudio con la sonda fluorescente DPH**

Las medidas de fluorescencia se realizaron a 20 °C en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50B utilizando rejillas entre 1 y 5 nm para la excitación y la emisión, respectivamente. Los espectros de fluorescencia para la sonda DPH (1, 6-difenil-1, 3, 5-hexatrien) se obtuvieron excitando a 350 nm y midiendo a 426 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Las soluciones “stock” de DPH se realizaron en THF (tetrahidrofurano) y se mantuvieron protegidas de la luz. Para la determinación de la CMC (concentración micelar crítica) de los peptoides, se añadieron cantidades del orden de microlitros de una disolución concentrada de peptoides a 1 ml de tampón MOPS (3-(*N*-morfolino)-propano –sulfónico)-NaOH 5 mM pH 7,0, conteniendo 5 µM de DPH. La fluorescencia relativa se analizó tras la homogeneización de la mezcla. La posible pequeña contribución de fluorescencia debida al tampón o a las disoluciones de peptoides se utilizó como línea base y se sustrajo en todos los experimentos.

### **5.11. Cribado de quimiotecas combinatorias**

El cribado de la quimioteca de peptoides se realizó partiendo de mezclas de compuestos a una concentración de 1 mg/mL en PBS 5% DMSO. Las mezclas se ensayaron a una concentración final en el ensayo de 0,2 mg/mL, en un volumen final de 20 µl en tampón A. Se realizó una preincubación de Apaf-1 con las mezclas de pseudopéptidos durante 30 °C, 30 min, en un volumen de 16 µL, tras lo cual se adicionó Cit c y PC9 completando 20 µL. Las reacciones se dejaron progresar 1 hora a 30 °C, y se sometieron a PAGE y a autorradiografía como se describe en el apartado 5.7.1.

Para determinar el porcentaje de activación de PC9 se cuantificó la intensidad de las bandas de zimógeno (PC9) y p35 utilizando el programa de análisis de imagen Quantity One de Biorad. El porcentaje de activación relativo a cada mezcla se calculó tomando el valor de la densidad óptica correspondiente a la banda p35 respecto a la suma de las bandas de PC9 y p35.



## Materiales y Métodos

$$\% \text{ activación} = \frac{\text{D.O. p35} \times 100}{\text{D.O. PC9} + \text{D.O. p35}}$$

Los valores de los porcentajes de activación relativos a cada mezcla se normalizaron respecto a los controles positivo y negativo, considerándose estos el 100 % y 0% de activación, respectivamente y se calcularon los valores correspondientes al inverso del porcentaje de activación, mediante la expresión:

$$1/\% \text{ activación} = \frac{\% \text{ Activación}_{C+}}{\% \text{ Activación}_{\text{Mezcla}} \times 100}$$

Siendo %Activación<sub>C+</sub> y % Activación<sub>Mezcla</sub> los porcentajes de activación correspondientes a las reacciones del control positivo y las mezclas, respectivamente.



## Discusión

---

La demostración de una conexión clara y directa entre la desregulación de la apoptosis y procesos patológicos ha suscitado la necesidad de identificar nuevos compuestos que modulen la maquinaria apoptótica. El conocimiento de la apoptosis ha sufrido un progreso espectacular desde el descubrimiento de la existencia de un programa de muerte celular fisiológica en *C.elegans*, hace 18 años. A medida que se ha ido adquiriendo conocimiento en este campo de la biología, se han ido definiendo un número de proteínas clave sobre las que actualmente se está investigando como punto de control diana para modular el proceso apoptótico con fines terapéuticos en un amplio espectro de enfermedades.

Entre las dianas farmacológicas moduladoras de la apoptosis se escogió el apoptosoma por su reciente descripción como complejo iniciador de la cascada de caspasas y apoptosis mitocondrial. Uno de los objetivos de este trabajo fue la puesta a punto del ensayo que permitiese el análisis funcional del apoptosoma *in vitro*, a través de la activación de PC9, utilizando sus componentes purificados. En general las menciones relativas al ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro* han sido escasas en la literatura, fundamentalmente porque solo los grupos de investigación de los Dres. Xiaodong Wang, George McLendon, Emad Alnemri y Jim Wells han publicado trabajos con la proteína Apaf-1 recombinante. La mayoría de los trabajos publicados que estudian la fisiología de Apaf-1 utilizan ensayos con extractos en los que Apaf-1 se encuentra en combinación con otras proteínas.

El primer paso para la puesta a punto del ensayo que permitiría analizar el procesamiento de PC9 en el apoptosoma fue la obtención de Apaf-1 recombinante y activo en cantidades suficientes para llevar a cabo ensayos funcionales. Para ello se procedió a la construcción de baculovirus recombinantes de Apaf-1, a la caracterización de su cinética de la expresión en células de insecto, a compatibilizar la calidad funcional de la proteína con el rendimiento requerido utilizando este sistema y a comprender el comportamiento *in vitro* de la proteína.

Desde el inicio del presente trabajo hasta la actualidad, el contexto en el que se enmarca el apoptosoma en la fisiología celular se ha ido perfilando paralelamente a la adquisición de nuevos conocimientos en el campo. Así, durante su desarrollo, se han descrito nuevas moléculas

## Discusión

moduladoras del apoptosoma y mecanismos de regulación desconocidos con anterioridad, se han descrito las distintas isoformas de Apaf-1 y su función y se ha descrito la existencia de distintas formas del complejo en células. También se ha cuestionado si el papel del apoptosoma sería el inicialmente propuesto como iniciador de la apoptosis mitocondrial o se trataría de un complejo amplificador de la señal apoptótica una vez ésta ha comenzado. Estos factores han tenido que ser tomados en cuenta durante el transcurso del trabajo para adaptar su desarrollo a las nuevas aportaciones científicas. Ello implicó el descartar la isoforma no funcional de Apaf-1 entre las proteínas en curso para expresar en baculovirus así como la revisión del tamaño de los apoptosomas formados durante la oligomerización del Apaf-1 obtenido en nuestro laboratorio. En algunas publicaciones se ha postulado que en el ensayo de reconstitución de apoptosomas *in vitro* un 95 % de los apoptosomas que se formaban lo hacían en su versión inactiva de 1,4 MDa (Cain *et al.*, 2000). En nuestras condiciones de laboratorio no se observó una tendencia del Apaf-1 producido hacia la formación preferente del apoptosoma de mayor tamaño, siempre y cuando el sistema se encontrase perfectamente definido en las condiciones óptimas, que implicaban que la proteína Apaf-1 de partida correspondiese una población molecular de alta proporción de Apaf-1 monomérico. Sí se observó tendencia a la agregación y pérdida de función de Apaf-1 proporcional al tiempo que se mantuviese a temperaturas iguales o superiores a 30 °C.

El siguiente de los objetivos planteados en este trabajo fue la identificación de moléculas moduladoras de la formación o actividad del apoptosoma que pudiesen afectar a las interacciones entre las distintas proteínas que forman el holoenzima. La aproximación que se planteó fue por un lado, el uso de la química combinatoria para la identificación de moléculas cabeza de serie y por otro el diseño de péptidos basados en la información disponible a cerca de la estructura de las proteínas que componen el apoptosoma.

En el inicio de este trabajo no existían precedentes en la literatura de compuestos moduladores de la apoptosis, cuya diana de acción fuese el apoptosoma. Actualmente existen moléculas identificadas a partir del cribado de quimiotecas de compuestos orgánicos que activan o inhiben la formación del apoptosoma en células. La utilización de ensayos en extractos como base de partida para su identificación implica que no se conoce la diana de actuación de tales compuestos, o si se conoce, se sabe que modulan la actividad del apoptosoma mediante la

interacción con otros componentes reguladores del complejo. Por lo tanto, este trabajo aporta la novedad de la identificación de un modulador cuya diana de inhibición es el apoptosoma y la demostración de su interacción física con Apaf-1.

De las tres quimiotecas que se ensayaron únicamente se detectaron compuestos activos en la de pseudopéptidos. Se definieron varias aminas en cada una de las tres posiciones, rescatándose una familia de siete peptoides a partir de una diversidad inicial de 5.120 moléculas. En concreto cuatro de los pseudopéptidos compuestos por las aminas A15 y A20 presentaron los mejores perfiles de inhibición del procesamiento de PC9 *in vitro* ( $IC_{50} = 20 \mu M$ ). La estructura primaria de estos compuestos hizo que por su hidrofobicidad se planteasen problemas de reproducibilidad en los ensayos de actividad por lo que se diseñaron y sintetizaron análogos del peptoide N-15-20-15-C. Los análogos sintetizados introducían un residuo cargado que aumentaba su solubilidad sin alterar sus propiedades biológicas (peptoide 1a: N-10-22-15-20-15-C). Asimismo se sintetizó una versión del peptoide 15-20-15 que incorporaba una deleción del residuo 15 C-terminal (peptoide 1d: N-10-22-15-20-C) y que resultó ser menos activo poniendo de manifiesto la importancia de la diclorofenilamina en la actividad biológica. Este hecho se constató ya desde los primeros ensayos de la quimioteca en los que las mezclas definidas con esta amina siempre mostraron actividad inhibidora. Además, en una de las pocas moléculas definidas como moduladores del apoptosoma, también aparece el grupo diclorobencilo formando parte de la molécula indicando que moléculas conteniendo un grupo diclorobencilo son capaces de activar la apoptosis induciendo la formación del apoptosoma en extractos libres de células y que además tienen actividad citostática y citotóxica en un amplio espectro de líneas celulares (Nguyen *et al.*, 2003). Estos compuestos actúan mediante un mecanismo desconocido que disminuye el umbral de Cit c requerido por el apoptosoma para oligomerizar.

La quimioteca de péptidos conformacionalmente definida en horquilla  $\beta$  se cribó utilizando un formato de ensayo que permitía analizar la presencia de moléculas con actividad inhibidora. La quimioteca de hélices  $\alpha$  se cribó con el objetivo de encontrar moléculas capaces de promover la activación de caspasas independiente de Cit c. En este cribado no se añadió Cit c al ensayo. Podrían considerarse otras versiones de cribado en el futuro basadas en la búsqueda de moduladores capaces de disminuir el umbral de Cit c necesario para activar el apoptosoma y la

## Discusión

activación de caspasas, en las que las mezclas en el ensayo contengan cantidades limitantes de Cit c.

Los péptidos sintetizados y diseñados a partir de la estructura de Cit c no modificaron la actividad del apoptosoma *in vitro* en las condiciones ensayadas. Aunque quedan abiertas cuestiones acerca de la actividad del hemopéptido, los resultados del cribado de la quimioteca de hélices  $\alpha$ , junto con los resultados obtenidos del ensayo de péptidos derivados de la estructura de Cit c, dan la idea de que para activar la oligomerización de Apaf-1 independiente de Cit c actuando como miméticos del mismo, habría que recurrir a moléculas de mayor entidad, dado que la superficie de interacción de Cit c con Apaf-1 es extensa. En el futuro, a medida que se aporten nuevos conocimientos estructurales del apoptosoma se podrá ampliar el marco de diseño racional de moléculas capaces de interferir a nivel de las distintas interacciones proteína-proteína que gobiernan la fisiología del apoptosoma.

Los resultados de inhibición obtenidos con los peptoides en el ensayo de reconstitución utilizando componentes purificados se validaron en extractos celulares de mamífero. Además los extractos se utilizaron en combinación con el ensayo de reconstitución de apoptosomas en el análisis del mecanismo de inhibición de Apaf-1 por el peptoide 1a. A pesar de que los resultados disponibles no permiten asignar a los pseudopéptidos un mecanismo definido a nivel molecular, es posible proponer diversas hipótesis acerca de la acción de los pseudopéptidos. En primer lugar, la inhibición tiene lugar entre los procesos de oligomerización y la captación de caspasa 9 por el oligómero. La fácil manipulación de los componentes del apoptosoma en el ensayo de reconstitución permitió un inicio de disección del mecanismo de acción de los pseudopéptidos indicando que la inhibición se producía independientemente del estado de oligomerización de Apaf-1, con lo que se descartó una acción de los peptoides a través de la inhibición de los procesos de unión de Cit c o de oligomerización. Otro experimento complementario que apoyó este resultado consistió en el aislamiento mediante filtración en gel de apoptosomas activos oligomerizados en presencia de Cit c y ATP correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 700 kDa y posterior ensayo de inhibición con el peptoide 1a. Los complejos de este peso molecular corresponden a la forma del apoptosoma mayoritariamente activa en células. Se observó que los apoptosomas oligomerizados de 700 kDa resultaron ser inhibibles por el peptoide 1a. Asimismo, la independencia del ATP para la

inhibición apoyarían la hipótesis de una inhibición en un paso posterior a la oligomerización de Apaf-1.

El hecho de que la inhibición de la activación de caspasas se reprodujese reconstituyendo la activación por complementación de fracciones de extracto FT con extracto F1 (conteniendo Apaf-1 endógeno) apoyó la idea de que la diana molecular de los peptoides son las moléculas de Apaf-1 y sugirió que si los peptoides eran internalizados adecuadamente era posible que tuviesen un efecto *in vivo*. Los resultados obtenidos mediante experimentos de polarización de la fluorescencia utilizando un análogo fluorescente del peptoide 1a demostraron que la diana de inhibición de estos compuestos son las moléculas de Apaf-1, obteniendo una constante de unión de  $K_d 57 \pm 12$  nM. Se trata del primer caso descrito de interacción directa de una molécula moduladora artificial con la proteína Apaf-1.

El valor de  $K_d$  resultante del experimento de polarización de la fluorescencia contrasta con los resultados obtenidos en los experimentos de dilución seriada en los ensayos de reconstitución y en extractos, en los que se obtenían valores de  $IC_{50}$  para el peptoide 1a del orden de 20  $\mu$ M según ensayos de reconstitución de apoptosomas y 10  $\mu$ M en ensayos de activación en extractos. Es posible que exista una unión inespecífica del peptoide con componentes del lisado de reticulocitos o del extracto de 293, con lo que la concentración efectiva del compuesto disponible para interactuar con Apaf-1 sería menor que la concentración real de compuesto presente.

Se realizaron experimentos para estudiar si el pseudopéptido 1a tenía un efecto sobre la formación de un apoptosoma de 700 kDa o de 1,4 MDa, favoreciendo la formación de un apoptosoma de mayor tamaño y menor actividad. Los resultados mostraron variabilidad en relación a las condiciones experimentales utilizadas no permitiendo llegar a una conclusión acerca de si los peptoides afectaban la maduración del apoptosoma o a la formación preferente de un tipo determinado de complejo, emplazando a futuros experimentos la respuesta a esta cuestión.

Además, en el presente trabajo se ha demostrado que los apoptosomas expuestos a concentraciones inhibitorias de peptoide 1a no son capaces de captar PC9 en el apoptosoma o conservarla unida. Habría que considerar aquí la posibilidad de que el pseudopéptido 1a indujese un cambio conformacional en Apaf-1, que impidiese el posterior reconocimiento de

## Discusión

PC9 por parte de Apaf-1. Este cambio conformacional afectaría mayoritariamente (directa o indirectamente) al dominio CARD de Apaf-1 impidiendo la unión de PC9 en el apoptosoma. La cinética de la interacción Apaf-1-pseudopéptido 1a es lenta, de unos 5-10 min, lo que podría apoyar la hipótesis de que el peptoide indujese un cambio conformacional en una proteína de tamaño considerable como Apaf-1. Otra posibilidad sería que el peptoide se uniese a una región de Apaf-1 receptiva a inhibidores celulares, no descritos hasta el momento. En estudios *in vivo* realizados sobre extractos de líneas celulares tumorales de ovario SKOV-3 se ha detectado incapacidad de activar PC3 inducida por Cit c y ATP. En estos extractos Apaf-1 es capaz de oligomerizar, pero incapaz de unir o retener PC9 en el apoptosoma lo que indica la existencia de un mecanismo de regulación del apoptosoma adicional a nivel de la captación o retención de PC9 en el complejo todavía no caracterizado (Liu *et al.*, 2002).

Los peptoides 1a y 1d se testaron respecto a su toxicidad celular utilizando un panel de células de osteosarcoma humano con el resultado de que concentraciones mayores de 20  $\mu\text{M}$  resultaban citotóxicas. Dada la elevada toxicidad observada y el desconocimiento de la internalización o no de los compuestos, posteriormente se amplió la colección de análogos del pseudopéptido N-15-20-15-C sintetizándose una versión ciclada del mismo, y dos versiones en las que el peptoide activo se incorpora covalentemente unido a las secuencias peptídicas de internalización celular; TAT y penetratina, así como a una secuencia de naturaleza pseudopeptídica igualmente diseñada para facilitar el acceso al interior de las células. El conjunto de estos pseudopéptidos se analizaron en un modelo "*in vivo*" utilizando células de leucemia humanas. Cuando se tratan células U937 con el agente citotóxico doxorubicina se induce apoptosis mediada por daño a DNA que implica a la mitocondria observándose despolarización y aparece fosfatidilserina (PS) expuesta en la cara exterior de la membrana celular. La incubación de los peptoides Cyc, TJa, y PEN no alteró la caída del potencial de membrana mitocondrial inducido por doxorubicina. Sin embargo el tratamiento con los peptoide Cyc, PEN, TAT y TJa disminuyó la exposición de PS considerablemente. El tratamiento con peptoide TJa 5  $\mu\text{M}$  y TAT 10  $\mu\text{M}$  inhibió la exposición de PS en membranas en su totalidad. En el caso de caso del tratamiento con los peptoides Cyc 7,5  $\mu\text{M}$  y PEN 2,5  $\mu\text{M}$  se previno además la pérdida de la viabilidad celular confirmando su efecto protector frente apoptosis. La inducción de la caída del potencial de membrana inducida por doxorubicina,



indicarían una inducción de la apoptosis mitocondrial y la consiguiente desestabilización de la mitocondria. La reducción parcial o total de la exposición de PS estaría en concordancia con una posterior inhibición de la activación de caspasas. Este resultado indica un efecto protector por parte de los peptoides activos frente al fenotipo apoptótico de que es responsable la activación de caspasas. Estos dos resultados conjuntamente indicarían que, a pesar de la desestabilización de la mitocondria los efectos de la activación de caspasas en células pueden ser bloqueados si se inhibe la activación del apoptosoma.

De nuevo, la posibilidad de interacción del compuesto con componentes del medio de cultivo (suero) o celulares añade incertidumbre acerca de cual es la concentración efectiva de compuesto que llegó a exponerse la diana en los ensayos *in vivo*. Por otro lado, la no internalización del peptoide, podría tener un efecto sinérgico con la citotoxicidad, al favorecer la interacción de los pseudopéptidos con componentes de la membrana celular.

Los resultados *in vivo* obtenidos en células de leucemia están de acuerdo con el efecto esperado de inhibición del apoptosoma, y validan la diana del apoptosoma como freno de la activación de caspasas y por tanto del fenotipo apoptótico que de ello se deriva.

En conclusión se ha identificado una familia de peptoides que unen Apaf-1 e inhiben su actividad biológica mediante la inhibición de interacciones proteína-proteína. Este hecho es destacable puesto que en la actualidad, en los programas de descubrimiento de nuevos fármacos, se plantea la modulación de interacciones proteína-proteína como base de una posible mejora a nivel de especificidad de nuevos fármacos. El problema es como modular con moléculas pequeñas superficies de interacción proteína-proteína superiores a 800 Å. En este caso, los resultados apuntan a que los peptoides activos identificados impiden el reclutamiento de PC9 por Apaf-1 que se establece a través de la interacción de los dominios CARD. Por tanto los peptoides deben inducir un cambio conformacional que impida dicha interacción. Una cuestión adicional es la validez de la diana y si es posible la recuperación de células desde una caída de potencial de membrana en mitocondrias. Los inhibidores de Apaf-1 constituyen una herramienta molecular para estudiar el papel del apoptosoma en distintos tejidos y utilizados en terapia conjunta con inhibidores de caspasas, podrán en un futuro constituir una esperanza para aquellas enfermedades en las que un exceso o desregulación de la apoptosis adquiere niveles patológicos.

## Discusión

## Conclusiones

---

- 1 Se ha conseguido obtener la proteína Apaf-1 recombinante activa y poner a punto la reconstitución de apoptosomas en un ensayo *in vitro*.
- 2 A través del cribado de la diversidad química que proporciona la quimioteca de peptoides se ha identificado una familia de pseudopéptidos cabeza de serie que inhiben la activación de caspasas dependiente del apoptosoma.
- 3 Procedimientos de química médica han permitido el diseño de análogos de los pseudopéptidos identificados, entre los cuales.  
3a) el peptoide 1a fl, análogo fluorescente del peptoide 1a fusionado a carboxifluoresceína, ha demostrado unión física con Apaf-1.  
3b ) los peptoides 1a, 1b y 1d han mejorado sus propiedades de solubilidad y reproducibilidad de su actividad biológica.
- 4 Los peptoides TJa, PEN, TAT y Cyc han mostrado protección frente a apoptosis inducida por doxorrubicina en células U937.



## Bibilografia

---

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**, 423–432.

Adams, J.M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.

Adams, J.M., Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 61-66.

Adams, J.M., Cory, S. (2002) Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 715-720.

Adrain, C., Slee, E.A., Harte, M.T., 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.

Adrain, C., Martin, S.J. (2001a) The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 390–397.

Adrain, C., Creagh, E.M., Martin, S. J. (2001b) Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* **20**, 6627–6636.

Asada, S., Choi, Y., Uesugi, M. (2003) A gene-expression inhibitor that targets an alpha-helix-mediated protein interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4992-4993.

Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. Eds. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons inc, New York.

Badley, A.D., Roumier, T., Lum, J.J., Kroemer, G. (2003) Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 298-305

Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N., 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.

Blanes-Mira C., Pastor, M.T., Valera, E., Fernandez-Ballester, G., Merino, J.M., Gutierrez

## Bibliografía

LM., Perez-Paya, E., Ferrer-Montiel, A. (2003) Identification of SNARE complex modulators that inhibit exocytosis from an alpha-helix-constrained combinatorial library. *Biochem. J.* **375**, 159-166.

Beem, E., Holliday, L.S., Segal, M.S. (2004) The 1.4-MDa apoptosome is a critical intermediate in apoptosome maturation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 664-672.

Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., 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.

Benchoua, A., Guegan, C., Couriaud, C., Hosseini, H., Sampaio, N., Morin, D., Onteniente, B. (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J.Neurosci.* **21**, 7127-7134.

Boatright, K.M., Salvesen, G.S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology.* **15**, 725-31.

Boyce, M., Degtrev, A., Yuan, J. (2004) Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ.* **11**, 29-37.

Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X.M., Butterworth, M., Alnemri, E.S., 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., Roberts, D. L., Cain, K., Cohen, G. M. (2001b) Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30-kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.* **8**, 425-433.

Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**, 645-652.

Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (approximately 700- kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 22686-22692.

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., 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., Langlais, C., Sun, X.M., Brown, D.G., Cohen, G.M. (2001a) Physiological concentrations of K<sup>+</sup> inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J. Biol. Chem.* **276**, 41985-41990.

Cain, K., Freathy, C. (2001b) Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett.* **120**, 307-315.

Cain, K. (2003) Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab. Rev.* **35**, 337-363.

Carbonell, T., Masip, I., Sanchez-Baeza, F., Delgado, M., Araya, E., Llorens, O., Corcho, F., Perez, J.J., Perez-Paya, E., Messeguer, A. (2000) Identification of selective inhibitors of acetylcholinesterase from a combinatorial library of 2,5-piperazinediones. *Mol. Divers.* **5**, 131-143.

Cameron R., Feuer G. (2000) Incidence of apoptosis and its pathological and biochemical manifestations. In: Cameron R, Feuer G, eds. *Apoptosis and its modulation by drugs*. Berlin: Springer – Verlag. **142**, 1-35.

Cecconi, F., AlvarezBolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., Gruss, P. (1998) Apaf 1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**, 727–737.

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855–862.

Cho, D.H., Hong, Y.M., Lee, H.J., Woo, H.N., Pyo, J.O., Mak, T.W., Jung, Y.K. (2004) Induced inhibition of ischemic/hypoxic injury by APIP, a novel Apaf-1-interacting protein. *J Biol Chem.* **279**, 39942-39950.

Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. (1997) *Biochem. J.* **326**: 1-16.

Cory, S., Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 647-656.

Cory, S., Huang, D.C., Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**, 8590-8607.

Cochran, A.G. (2000) Antagonists of protein-protein interactions. *Chem. Biol.* **7**: 85-94.

Cochran, A.G. (2001) Protein-protein interfaces: mimics and inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 654-659.

## Bibliografia

Concannon, G.C., Orrenius, S., Samuli, A. (2001) Hsp 27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both procaspase 3 and cytochrome c. *Gene Expr.* **9**, 195-201.

Cozzolino, M., Ferraro, E., Ferri, A., Rigamonti, D., Quondamatteo, F., Ding, H., Xu, Z.S., Ferrari, F., Angelini, D.F., Rotilio, G., Cattaneo, E., Carri, M.T., Cecconi, F. (2004) Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration. *Cell Death Differ.* **11**, 1179-1191.

Creagh, E.M., Martin, S.J. (2001) Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 696-702.

Creagh, E.M., Martin, S.J. (2003a) Cell stress-associated caspase activation: intrinsically complex? *Sci. STKE.* **175**, 1-5.

Creagh, E.M., Conroy, H., Martin, S.J. (2003b) Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* **193**, 10-21.

Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**, 233-249.

Czerski L, Nunez G. (2004) Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 643-652.

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.

Davies, A.H. (1994) Current methods for manipulating baculoviruses. *Biotechnology* **12**, 47-50.

Degtarev, A., Lugovskoy, A., Cardone, M., Mulley, B., Wagner, G., Mitchison, T., Yuan, J. (2001) Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat. Cell Biol.* **3**, 173-182.

Degtarev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**, 8543-8567.

Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* **17**, 2215-2223.

Deveraux, Q. L., Reed, T. C. (1999) IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.



- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W., Dixit, V.M. (1996) ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* **271**, 16720-16724.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383–424.
- Ekert, P.G., Silke, J., Vaux, D.L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* **6**, 1081-1086
- Elliot, G., O'Hare, P. (1997) Intracellular trafficking and protein delivery by a herpes virus structural protein. *Cell* **88**, 223-233.
- Ellis H.M., Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell* **44**, 817-829.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J. C. (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 929–935.
- Esteve, V., Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla A., Aligue, R., Agell, N., Mingarro, I., Bachs O., Perez-Paya, E. (2003) The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition. *Chembiochem.* **4**, 863-869.
- Fearnhead, H.O., McCurrach, M.E., O'Neill, J., Zhang, K., Lowe, S.W., Lazebnik, Y.A. (1997) Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells. *Genes.Dev.* **11**, 1266-1276.
- Fearnhead, H.O., Rodriguez, J., Govek, E.E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G., Lazebnik, Y.A. (1998) Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13664-13669.
- Fearnhead H.O. (2001) Cell-free systems to study apoptosis. *Methods Cell. Biol.* **66**, 167-185.
- Ferraro E, Corvaro M, Cecconi F. (2003) Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J. Cell Mol. Med.* **7**, 21-34.
- Ferrer-Montiel, A.V., Merino, J.M., Blondelle, S.E., Perez-Paya, E., Houghten, R.A., Montal, M. (1998) Selected peptides targeted to the NMDA receptor channel protect neurons

## Bibliografía

from excitotoxic death. *Nat. Biotechnol.* **16**, 286-291.

Fortin, A., Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Kushwaha, N., Hickman, E.S., Thompson, C.S., Hakim, A., Albert, P.R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D.S., Slack, R.S. (2001) APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J. Cell Biol.* **155**, 207-216.

Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1998) Cellular uptake of the TAT protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193.

Frengen, E., Wu, C., De Jong, P. (1997) Transfer of small YACS to E.coli as large circular plasmids. *Genet. Anal.* **14**, 55-59.

Friedlander, R.M. (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1365-1375.

Fujimoto, A., Takeuchi, H., Taback, B., Hsueh, E.C., Elashoff, D., Morton, D.L., 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

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836- 5840.

Gadek, T.R., Nicholas, J.B. (2003) Small molecule antagonists of proteins. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1-8.

Gamen, S., Anel, A., Lasierra, P., Alava, M.A., Martinez-Lorenzo, M.J., Pineiro, A., Nava, J. Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. (1997) *FEBS Lett.* **417**, 360-364.

Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* **273**, 32608-32613.

García-Martínez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De la Peña, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Pérez-Paya, E., Belmonte, C., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A. (2002) Attenuation of thermal noniception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2374-2379.

Garden GA, Budd SL, Tsai E, Hanson L, Kaul M, D'Emilia DM, Friedlander RM, Yuan J, Masliah E, Lipton SA. (2002) Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated

neurodegeneration. *J. Neurosci.* **22**, 4015-4024.

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S., Nicholson, D.W. (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* **97**, 395-406.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* **2**, 156-162.

Gonzalez-Navarro, H., Mora, P., Pastor, M., Serrano, L., Mingarro, I., Perez-Paya, E. (2000) Identification of peptides that neutralize bacterial endotoxins using beta-hairpin conformationally restricted libraries. *Mol. Divers.* **5**, 117-126.

Green, M., Loewenstein, P.M., (1998) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179-1188.

Green, D.R., Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.

Green, D.R., Beere, H.M. (2001) Apoptosis. Mostly dead. *Nature* **412**, 133-135.

Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911.

Gustafsson AB, Gottlieb RA. (2003) Mechanisms of apoptosis in the heart. *J. Clin. Immunol.* **23**, 447-459.

Hajra KM, Liu JR. (2004) Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* **9**, 691-704.

Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Hartig, P.C., Cardon, M.C. (1992) Rapid efficient production of baculovirus expression vectors. *J. Virol. Methods.* **38**, 61-70.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 432-438.

Hengartner, M. O. (1998) Apoptosis. Death by crowd control. *Science* **281**, 1298-1299.

## Bibliografía

- Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776.
- Hill, M.M., Adrain, C., Martin, S.J. (2003) Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol. Interv.* **3**, 19-26.
- Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* **23**, 2134-2145.
- Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 155–156.
- Houghten, R.A., Pinilla, C., Blondelle, S.E., Appel, J.R., Dooley, C.T., Cuervo, J.H. (1991) Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **354**, 84-86.
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M., Nunez, G. (1998a) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self association and procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 33489-33494.
- Hu, Y. M., Benedict, M. A., Wu, D. Y., Inohara, N., Nunez, G. (1998b) Bcl-X-L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-I-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4386–4391.
- Hu, Y. M., Benedict, M. A., Ding, L. Y., Nunez, G. (1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* **18**, 3586–3595.
- Humet, M., Carbonell, T., Masip, I., Sanchez-Baeza, F., Mora, P., Canton, E., Gobernado M., Abad, C., Perez-Paya, E., Messeguer, A. (2003) A positional scanning combinatorial library of peptoids as a source of biological active molecules: identification of antimicrobials. *J. Comb. Chem.* **5**, 597-605.
- Jia, L., Srinivasula, S.M., Liu, F.T., Newland, A.C., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 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., Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf- 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 31199–31203.
- Jiang, X., Kim, H.E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S.C., Rosenberg, S., Wang, X. (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-

alpha in a death regulatory pathway. *Science* **299**, 223–226.

Jiang X, Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 87-106.

Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1864-1868.

Joliot, A., Prochiantz, A. (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell Biol.* **6**, 189-196.

Kamarajan, P., Sun, N.K., Sun, C.L., Chao, C.C. (2001) Apaf-1 overexpression partially overcomes apoptotic resistance in a cisplatin-selected HeLa cell line. *FEBS Lett.* **505**, 206-212.

Kaushal G.P., Basnakian A.G., Shah S.V. (2004) Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **66**, 500-506

Kimura, M., Kurukawa, T., Abe, Yatsuoka, T., Youssef, E.M., Yokohama, T (200) Identification of two common regions of allelic loss in chromosome arm 12q in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* **58**, 2456-2460.

Kitada, S., Pedersen, I.M., Schimmer, A.D., Reed, J.C. (2002) Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* **21**, 3459-3474.

Kitts, P.A., Ayres, M.D., Possee, R.D. (1990) Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5667-5672.

Kitts, P.A. Possee, R.D. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* **14**, 810-87.

Kitts, P.A., Green, G. (1999) An immunological assay for determination of baculovirus titers in 48 hours. *Anal. Biochem.* **268**, 173-178.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 132–1136.

Kluck, R.M., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Naiem, S., Yaffe, M.P., Margoliash, E., Bredesen, D., Mauk, A.G., Sherman, F., Newmeyer, D.D. (2000) Determinants of cytochrome *c* pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 16127-16133.

Kornblau, S.M. (1998) The role of apoptosis in the pathogenesis, prognosis, and therapy of hematologic malignancies. *Leukemia* **12**, 41-46.

## Bibliografia

- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**, 325–337.
- Kuida, K. (2000) Caspase-9. *Int J Biochem. Cell Biol.* **32**, 121-124.
- Lademann, U., Cain, K., Gyrd-Hansen, M., Brown, D., Peters, D., Jaattela, M. (2003). Diarylurea compounds inhibit caspase activation by preventing the formation of the active 700-kilodalton apoptosome complex. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7829-7837.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lauber, K., Appel, H.A., Schlosser, S.F., Gregor, M., Schulze-Osthoff K., Wesselborg, S. (2001) The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 29772–29781.
- Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G., and Earnshaw, W.C. (1993) Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell. Biol.* **123**, 7-22.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.E. (1995) Characterization of the execution phase of apoptosis *in vitro* using extracts from condemned phase cells. *J. Cell Sci.* (Suppl. 19), 41-49.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99.
- Li, M., Ona, V.O., Guegan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., Friedlander, R.M. (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* **288**, 335-339.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489
- Lingor, P., Koeberle, P., Kugler, S., Bahr, M. (2005) Down regulation of apoptosis

- mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo. *Brain*.
- Liu, J. R., Opipari, A.W., Tan, L., Jiang, Y., Zhang, Y., Tang, H., Nuñez, G. (2002) Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res.* **62**, 924–931.
- 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.
- Love, S. (2003) Apoptosis and brain ischemia *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **27**, 267-282.
- Luckow, V.A. (1993a) Baculovirus systems for the expression of human gene products *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 564-572.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F. Olins, P.O. (1993b) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, **67**, 4566-4579.
- Luckow, V.A. Shuler, M.L., Wood, H.A., Granados, R.R. and Hammer, D.A. (1995a) In *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides* (Ed.), Wiley-Liss, Inc., New York.
- Luckow, V.A. (1995b) In *Principles and Practice of Protein Engineering*, Cleland, J.L. and Craik, C.S. (Ed.), John Wiley and Sons, New York.
- Macleod, K. (2000) Tumor suppressor genes. *Curr. Op.in Genet.Dev.* **10**, 81-93.
- Martin, A.G., Fearnhead, H.O. (2002) Apocytochrome *c* blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 50834-50841.
- Martin JB. (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1970-1980.
- Martin, S. J. (2001) Dealing the CARDS between life and death. *Trends. Cell Biol.* **11**, 188-189.
- Martinou, J. C., Green, D. R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 63–67.
- Martinou, J.C., Desagher, S., Antonsson, B. (2000) Cytochrome *c* release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 41-43.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for

## Bibliografía

apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* **187**, 1261-1271.

Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Lopez-Royuela, N., Gomez-Benito, M., Larrad, L., Lasierra, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., Nava, J. (2004) Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **18**, 1599-1604.

Mas, V., Perez, L., Encinar, J.A., Pastor, M.T., Rocha, A., Perez-Paya, E., Ferrer-Montiel, A., Gonzalez Ros, J.M., Estepa, A., Coll, J.M. (2002) Salmonid viral haemorrhagic septicaemia virus: fusion-related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoprotein G or a combinatorial library. *J. Gen. Virol.* **83**, 2671-2681.

Marsden, V.S., O'Connor, L., O'Reilley, L.A., Silke J., Metcalf D., Ekert PG., Huang DC., Cecconi F., Kuids K., Tomaselli KJ., Roy S., Nicholson DW., Vaux DL., Bouillet P., Adams J., Strasser A. (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* **419**, 634-637.

Miller, S.M., Smon, R.J., Ng, S., Zuckermann, R.N., Kerr, J.M., Moos, W.H. (1994) Proteolytic studies of homologous peptide and N-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2657-2662.

Mitchell, D., Kim, D.T., Steinman, L., Fathman, C.G., Rothbard, J.B. (2003) Poliarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.* **56**, 318-325.

Mochizuki, H., Mizuno, Y. (2003) Gene therapy for Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **65**, 205-213.

Montoliu, C., Humet, M., Canales, J.J., Burda, J., Planells-Cases, R., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., Perez-Paya, E., Messeguer, A., Ferrer-Montiel, A., Felipe, V. (2002) Prevention of *in vivo* excitotoxicity by a family of trialkylglycines, a novel class of neuroprotectants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 29-36.

Morishi, K., Huang, D. C. S., Cory, S., Adams, J. M. (1999) Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9683-9688.

Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol.* **19**, 1173-1176.



- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M., Reed, J.C. (1994) Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an orgnelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**, 353-374.
- Nguyen, J., T., and Wells, J., A. (2003) Direct activation of the apoptosis machinery as mechanism to target cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **100**, 7533-7538.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Ilabelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N., Raju, S., Smulson, M., Yamin, T., Yu, V., Miller, D. (1995) Identificaton and inhibition of the ICE/CED 3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.
- Nicholson, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **6**, 1028–1042.
- Nicholson, D.W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**, 810-816.
- Ogawa, T., Shiga, K., Hashimoto, S., Kobayashi, T., Horii, A., Furukawa, T. (2003) APAF-1-ALT, a novel alternative splicing form of APAF-1, potentially causes impeded ability of undergoing DNA damage-induced apoptosis in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**, 537-543.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H., Friedlander, R.M. (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**, 263-267.
- Onteniente, B. (2004) Natural and synthetic inhibitors of caspases: targets for novel drugs. *Curr. Drug Targets C.N.S. Neurol. Disord.***3**, 333-340.
- Orner, B.P., Ernst, J.T., Hamilton, A.D. (2001) Toward proteomimetics: terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an alpha-helix. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5382-5383.
- O'Reilly, D.R., Millar, L.K. and Luckow, V.A. (1992) Baculovirus Expresión Vectors: A Laboratory Manual, W.H. Freeman and company, New York.

## Bibliografía

Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000) 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., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000) 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.

Pardridge, W.M. (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 131-139.

Pastor, M.T., Lopez de la Paz, M., Lacroix, E., Serrano, L., Perez-Paya, E. (2002) Combinatorial approaches: a new tool to search for highly structured beta-hairpin peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 614-619.

Pastor, M.T., Mora, P., Ferrer-Montiel, A., Perez-Paya, E. (2004) Design of bioactive and structurally well-defined peptides from conformationally restricted libraries. *Biopolymers* **76**, 357-365.

Peretto, I., Sanchez-Martin, R.M., Wang, X.H., Ellard, J., Mittoo, S., Bradley, M. (2003) Cell penetrable peptoid carrier vehicles: synthesis and evaluation. *Chem. Commun. (Camb.)* **21**, 2312-2313.

Pérez Payá, E., Bachs, O., Canela, N., Messeguer, A., Masip, I., Tarrasón, G., Cases, C., Piulats, J. Merck KGaA, Patent I03/04, Germany, **2003**.

Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., Vousden, K.H. (1997) Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* **11**, 1853-1863.

Planells-Cases, R., Aracil, A., Merino, J.M., Gallar, J., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Gonzalez-Ros, J.M., Ferrer-Montiel, A.V. (2000) Arginine-rich peptides are blockers of VR-1 channels with analgesic activity. *FEBS Lett.* **481**, 131-136.

Pollock, W.B., Rosell, F.I., Twitchett, M.B., Dumont, M.E., Mauk, A.G. *Biochemistry* (1998) **37**, 6124-6131

Potocky, T.B., Menon, A.K., Gellman, S.H. (2003) Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 50188-58194.

- Purring-Koch, C., Zou, H., Wang, X., Mc Lendon, G. (1999) Stoichiometry, free energy and kinetic aspects of Cc: Apaf-1 Binding in apoptosis. *J.Am.Chem.Soc.* **121**, 7435-7436.
- Purring-Koch, C., 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., Shi, Y. (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* **10**, 549–557.
- Reed, J.C. (2002) Apoptosis-based therapies. *Nature* **1**, 111-121.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott, F.L., Liddington R.C., and Salvesen, G.S. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14250–14255.
- Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., Cattaneo, E. (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J. Biol. Chem.* **276**, 14545-14548.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179–3184.
- Rong, P., Bennie, A.M., Epa, W.R., Barrett, G.L. (1999) Nerve growth factor determines survival and death of PC12 cells by regulation of the bcl-x, bax, and caspase-3 genes. *J. Neurochem.* **72**, 2294-300.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S. (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* **2**, 476–483.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., 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., Garcia-Saez, A.J., Malet, G., Mingarro, I., Perez-Paya, E. (2002) Peptides in apoptosis research. *J. Pept. Sci.* **8**, 543-560.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10964-10967.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

## Bibliografía

Serrone, L., Hersey, P. (1999) The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res.* **9**, 51–58.

Shi, Y. (2002a) Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb.)* **10**, 285–288.

Shi, Y. (2002b) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459–470.

Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487.

Shiozaki, E.N., Chai, J., Rigotti, D.J., Riedl, S.J., Li, P., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Fairman, R., Shi, Y. (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* **11**, 519–527.

Simon, R.J., Kania, R.S., Zuckermann, R.N., Huebner V.D., Jewell, D.A., Bsnville, S., Ng., S., Wang, L., Rosenberg, S., Marlowe, C.K. (1992) Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9367-9371.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**, 281–292.

Slee, E.A., Keogh, S.A., Martin, S.J. (2000) Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalyzed by Caspase-3: A potential feedback loop for amplification of apoptosis associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ.* **7**, 556–565.

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. (2001) Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant, roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 7320–7326.

Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E.J. (1999) The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 181–184.

Soengas, M.S., Alarcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W., Lowe, S. (1999) Apaf-1 and Caspase 9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science.* **284**, 156-159.

- Soengas, M.S., Capodiecì, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W. (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**, 207–211.
- Soengas, M.S., Lowe, S.W. (2003) Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**, 3138-3151.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell.* **1**, 949-957.
- Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., Alnemri, E.S. (2000) Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 36152–36157.
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E.S. (2001a) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112–116.
- Srinivasula, S.M., Saleh, A., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (2001b) Isolation and assay of caspases. *Methods Cell Biol.* **66**, 1-27.
- Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J.C., Froelich, C.J., Salvesen, G.S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **273**, 27084-27090.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. (1999a) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* **274**, 8359–8362.
- Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. (1999b) Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* **6**, 1054-1059.
- Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. (2000a) Caspase assays. *Methods Enzymol.* **322**, 91-100.
- Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. (2000b) Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 299-306.
- Stennicke, H.R., Ryan, C.A., Salvesen, G.S. (2002) Reprieval from execution: the molecular

## Bibliografia

basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 94-101.

Stockwell, B.R. (2000) Chemical genetics. Ligand-based discovery of gene function. *Nature Reviews Genet.* **1**, 116-125.

Sundberg, E.J., Mariuzza, R.A. (2000) Luxury accommodations: the expanding role of structural plasticity in protein-protein interactions. *Structure Fold Des.* **8**, 137-1342.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* **8**, 613-621.

Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandesalnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: Multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8395-8400.

Takatani, T., Takahashi, K., Uozumi, Y., Shikata, E., Yamamoto, Y., Ito, T., Matsuda, T., Schaffer, S.W., Fujio, Y., Azuma, J. (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 49-53.

Tan, J., Town, T., Placzek, A., Kundtz, A., Yu, H., Mullan, M. (1999) Bcl-X(L) inhibits apoptosis and necrosis produced by Alzheimer's beta-amyloid1-40 peptide in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **272**, 5-8.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.

Toogood, P.L. (2002) Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J. Med. Chem.* **45**, 1543-1558.

Van Loo, G., Saelens, X., Van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S.J., Vandenabeele, P. (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one

bullet. *Cell Death Differ.* **9**, 1031-1042.

Umezawa, N., Gelman, M.A., Haigis, M.C., Raines, R.T., Gellman, S.H. (2002) Translocation of a beta-peptide across cell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 368-369.

Valera, E., Fernandez-Salguero, P.M., Planells-Cases, R., Messeguer, A., Van Den Nest, W., Carreno, C., Ferrer-Montiel, A., Merino, J.M. (2002) Neuroprotection against excitotoxicity by N-alkylglycines in rat hippocampal neurons. *Neuromolecular Med.* **2**, 271-80.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.

Wang, J., Rammayaran, K. (1999) Towards designing drug like libraries: a novel computational approach for prediction of drug feasibility of compounds. *J. Comb. Chem.* **1**, 524-533.

Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-33.

Watanabe, T., Hirota, Y., Arakawa, Y., Fujusawa, H., Tachibana, O., Hasegawa, H., Yamashita, J., Hayashi, Y. (2003) Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. *Brain Pathol.* **13**, 431-439.

Wei, Y., McLendon, G.L., Hamilton, A.D., Case, M.A., Purring, C.B., Lin, Q., Park, H.S., Lee, C.S., Yu, T. Disruption of protein-protein interactions: design of a synthetic receptor that blocks the binding of cytochrome c to cytochrome c peroxidase. (2001) *Chem. Commun. (Camb)*. 1580-1581.

Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, E.T., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13003-13008

Wolf, B.B., Schuler, M., Li, W., Eggers-Sedlet, B., Lee, W., Taylor, P., Fitzgerald, P., Mills, G.B., Green, D.R. (2001) Defective 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.

Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**, 1008-12.

Yamamoto, H., Gil, J., Schwartz, S. Jr, Perucho, M. (2000) Frameshift mutations in Fas,

## Bibliografia

Apaf-1, and Bcl-10 in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cell Death Differ.* **7**, 238-239.

Yang, X. L., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355–1357.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129–1132.

Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., Maruyama, Y. (1998) Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* **97**:, 276-81.

Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., Mak, T.W. (1998) Apaf is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**, 739–750.

Yoshida, H. The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor (2003) *Cell Structure and Function* **28**, 3-9.

Yu, T., Wang, X., Purring-Koch, C., Wei, Y., McLendon, G. L. (2001) A mutational epitope for cytochrome C binding to the apoptosis protease activation factor-1. *J.Biol. Chem.* **276**, 13034-13038.

Yuan, J., Yankner, B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature.* **407**, 802-9.

Yuan, J., Lipinski, M., Degterev, A. (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* **40**, 401-413.

Zhang, X., Jackson, J.K., Burt, H.M. (1996) Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **31**, 145-150.

Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Flavell, R.A. (2000) Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ.* **6**, 1043-53.

Zheng, T.S. (2000) Death by design: the big debut of small molecules. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 43-46.

Zhou, P., Chou, J., Olea, R. S., Yuan, J. Y., Wagner, G. (1999) Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adapter/caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11265–11270.



Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, B.Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A.S., Hartley, D.M., Wu du, C., Gullans, S., Ferrante, R.J., Przedborski, S., Kristal, B.S., Friedlander, R.M. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74-78.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. S., Lutschg, A., Wang, X. D. (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., 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., Wang, J., Sun, C., Fesik, S.W., Wu, J.C., Tomaselli, K.J., Armstrong. (2003) Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* **278**, 8091–8098.

Zutshi, R., Brickner, M., Chmielewski, J. (1998) Inhibition of the assembly of protein-protein interfaces. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 62-66.