



Universitat de Lleida

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**Identificació i caracterització dels executors
de la mort cel·lular per isquèmia en els
cardiomiòcits**

Núria Bahi i Pla

Lleida, 14 de Març de 2008



Daniel Sanchis Morales, Doctor en Ciències Biològiques, investigador *Ramon y Cajal* al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida i director de la present tesi,

Faig constar que,

La llicenciada en Bioquímica per la Universitat Autònoma de Barcelona i llicenciada en Biologia per la Universitat de Girona, **Núria Bahi i Pla**, ha realitzat sota la meua direcció i supervisió dins del grup de *Senyalització Cel·lular i Apoptosi* del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, el treball experimental titulat “*Identificació i caracterització dels executors de la mort cel·lular per isquèmia en els cardiomiòcits*”.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s’escau, obtenir el grau de **Doctora** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a

Lleida, 14 de gener de 2008

Dr. Daniel Sanchis Morales, *PhD*

A en Jaume i a la meva família

Agraiments

Agraeixo al meu director de tesi, Daniel Sanchis, l'oportunitat de venir a Lleida a fer el doctorat i tota l'ajuda que m'has donat al llarg d'aquests anys per a poder-lo finalitzar amb èxit. Gràcies Marta per tots els consells i l'ajuda durant aquests anys.

Gràcies a l'AGAUR i al Fons Social Europeu pel finançament del meu treball predoctoral que m'ha permès concloure aquesta tesi.

谢谢继生 Gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, por las clases de chino, y por contagiarme un poco de filosofía oriental para afrontar la vida con más optimismo.

Vull agrair també a la Raffaella i la Sonia per la vostra amistat dins i fora del laboratori, per animar-me a seguir quan volia plegar,... Per tots pels punts del Hong Kong que juntes hem aconseguit en tants dinars entre experiment i experiment. Los viajes al rectorado ya no son lo mismo sin pararse a comer un donut, Raffaella. He trobat molt a faltar discutir els cotilleos amb tu, Sonia.

Agraeixo al Miquel, la Carme, la Mary i la Yolanda per l'acollida al grup que em van donar quan vaig aterrar aquí, en part gràcies a la meva afició als cargols, tot i que no m'agradi el futbol.

Maya y Mónica gracias por el intercambio cultural durante estos años, por la Banitza, por dejarme contaros la historia de Catalunya mil veces y por intentar enseñarme algo de rumano y búlgaro. Y gracias también Andree por tu amistad, por nuestros cafés y reuniones..., y por discutir de ciencia conmigo.

Isu, Roser i Rosa. Per tota l'ajuda tècnica i pel intentar que tot funcioni en un laboratori amb una tendència al caos molt marcada, gràcies.

Agraeixo al Carles, i també a la Judit, per la nova oportunitat de seguir fent el que més m'agrada. Espero que a tots ens sigui molt profitós.

A la resta de companys del laboratori de investigació Rosa Soler, Mario, Xavi, Esteban, David, Núria E., Annabel, Arindam, Ana V., Dolors, gràcies pels anys de companyerisme, per continuar organitzant tot tipus de sopars.

També agraeixo a les noies de Nefro: Sara, Eva, Anna C., Petya per les xerrades compartides, per les escapades al carrer Major,... Gracias Jose Manuel por proveernos de los nuevos capítulos de Grey, y por casi convencerme de las ventajas de hacer un postdoc en EEUU.

Gracias Natalia, por la paciencia que demostraste en enseñarme el cultivo de cardios adultos y por tus amables respuestas a todas mis dudas durante estos años; y también a todos tus compañeros en la Universidad de Navarra y al Dr. Javier Diez, por la cálida bienvenida en vuestro laboratorio.

Gràcies a tota la colla de Biologia 96/00, Marta, Jordi, Sara, Isaac, Laura, Anna, Ivan, Xevi, Rosa, Alfons i Meritxell, seguir tenint la vostra amistat després de tants anys és molt important per mi, encara que alguns gairebé no ens veiem. Si l'any que ve el tema de l'amic invisible tornen a ser els llibres us regalaré un exemplar de la tesi a cadascun.

Gràcies també a qualsevol que m'hagi pogut oblidar amb les presses.

Moltíssimes gràcies a tota la meva família, als meus sogres i al meu xicot per la paciència i la comprensió que han hagut de tenir per a que jo pogués portar aquest projecte a bon port. Sobretot a en Jaume per aquests últims dies de la preparació de tesi que sé que han estat difícils.

Gràcies a tots,

Núria.

Índex de continguts

ÍNDEX DE CONTINGUTS	I
RESUM	VII
ABREVIACIONS	XV
INTRODUCCIÓ	1
1. MORT CEL·LULAR I MECANISMES IMPLICATS	3
1.1 MECANISMES DE MORT DEPENDENTS DE CASPASES	4
1.1.1 Caspases	4
1.1.2 Via extrínseca de l'apoptosi	8
1.1.3 Via intrínseca de l'apoptosi	11
1.1.3.1 Proteïnes de la família de Bcl2	13
a) Membres antiapoptòtics: Bcl2 i BclXL.....	14
b) Membres proapoptòtics: Bax i Bak.....	15
c) Membres BH3-only de la família de Bcl2.....	17
1.1.3.2 Paper del mitocondri en la via de mort intrínseca	21
a) Permeabilització directa de la membrana externa	22
b) Permeabilitat de transició de la membrana interna	24
c) Relació entre ambdós mecanismes de permeabilitat mitocondrial...	26
1.1.3.3 Formació de l'apoptosoma	27
1.1.4 Família de IAP o proteïnes inhibidores d'apoptosi	28
1.1.5 Funcions no apoptòtiques dels efectors i reguladors de les vies de mort dependents de caspases	30
a) Caspases	30
b) Molècules de la via dels receptors de mort	31
c) Membres de la família de Bcl2.....	33
1.2 VIES DE MORT INDEPENDENTS DE CASPASES	36
1.2.1 AIF o Apoptotic Inducing Factor	36
1.2.2 Endonucleasa G o EndoG.....	39
1.2.3 OMI/HtrA2	39
1.3 AUTOFÀGIA	40

Índex de continguts

2. COR: FISIOLOGIA I PATOLOGIES	43
2.1 FISIOLOGIA DEL COR.....	43
2.2 FISIOLOGIA DEL CARDIOMIÒCIT	43
2.2.1 Estructura subcel·lular del cardiomiòcit	44
2.2.2 Proliferació, diferenciació i hipertròfia en el període postnatal	45
2.2.3 Apoptosi i desenvolupament cardíac	46
2.3 PATOLOGIES CARDÍAQUES	48
2.3.1 Cardiopatia isquèmica i infart de miocardi.....	48
2.3.2 Altres patologies cardíques no isquèmiques.....	52
2.3.2.1 Cardiomiopatia dilatada.....	52
2.3.2.2 Cardiotoxicitat per fàrmacs	53
2.3.2.3 Cardiopatia alcohòlica	54
2.3.2.4 Rebuig del trasplantament cardíac.....	55
2.3.3 Insuficiència cardíaca	55
3. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA AL COR.....	57
OBJECTIUS	63
MATERIALS I MÈTODES	67
1. TÈCNiques DE BIOLOGIA CEL·LULAR	69
1.1 CULTIUS CEL·LULARS	69
1.1.1 Cultiu de cardiomiòcits embrionals de rata	69
1.1.2 Cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata.....	69
1.1.3 Cultiu de cardiomiòcits adults de rata	70
1.1.4 Cultiu de fibroblasts cardíacs, de pell i de pulmó.....	71
1.1.5 Línia cel·lular HEK293T	72
1.1.6 Congelació i descongelació de línies cel·lulars	72
1.1.7 Inducció de isquèmia en cultius cel·lulars	73
1.2 RECOMPtes CEL·LULARS	73
1.2.1 Recomppte de viabilitat amb Blau Tripà.....	73

1.2.2 Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst i immuno- citoquímica anti-caspasa 3 activa en cèl·lules fixades.....	74
1.3 TINCIONS CEL·LULARS	75
1.3.1 Tinció de TUNEL.....	75
1.4 ASSAIGS D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	76
1.4.1 Assaig d'activitat de caspases executores i de caspasa 8	76
1.5 PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS	76
1.5.1 Transfecció amb polietilenamida (PEI).....	76
1.5.2 Producció de lentivirus en cèl·lules 293T.....	77
1.5.3 Concentració dels lentivirus i emmagatzematge	78
1.5.4 Transducció de cultius cel·lulars primaris amb lentivirus	78
2. TÈCNiques DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR.....	81
2.1 ESTUDI DE LA INTEGRITAT DE L'ADN.....	81
2.2 CONTRUCCIONS PLASMÍDIQUES.....	82
2.2.1 Protocol general pel clonatge d'un insert d'ADN en un plàsmid.....	82
2.2.2 Clonatge de les construccions de shRNAi.....	83
2.2.2.1 Subclonatge dels shRNAi en el vector pSuperRetroPuro	85
2.2.2.2 Subclonatge dels shRNAi en el vector lentiviral pLVTHM.....	85
2.2.2 Clonatge de la construcció de EndoG-FLAG.....	87
2.2.2.1 Subclonatge en el plàsmid pcDNA3-FLAG3'	87
2.2.2.2 Subclonatges de EndoG-FLAG al vector lentiviral.....	87
2.3 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER RT-PCR	88
2.3.1 Comprovació del funcionament dels shRNAi.....	88
2.4 IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES	89
2.4.1 Immunocitoquímica.....	89
2.4.2 Assaig de Western Blot	92
2.4.2.1 Extracció proteïna total en SDS.....	92
2.4.2.2 Extracció proteïna citosòlica	92
2.4.2.3 Extracció proteïna nuclear	93
2.4.2.4 Quantificació de proteïnes pel mètode de Lowry	93
2.4.2.5 Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida	94

Índex de continguts

2.4.2.6 Transferència de proteïnes.....	95
2.4.2.7 Immunodetecció de proteïnes.....	95
2.4.3.8 Tinció de gels de SDS-PAGE i de membranes de PVDF	96
RESULTATS	97
Objectiu n°1	99
Objectiu n°2.....	111
Subobjectiu n°2a.....	111
Subobjectiu n°2b.....	127
Subobjectiu n°2c.....	143
DISCUSSIÓ	159
CONCLUSIONS	173
REFERÈNCIES	177
ANNEX 1: Bcl2 is a Key Factor for Cardiac Fibroblasts Resistance to Programmed Cell Death	
ANNEX 2: Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development	
ANNEX 3: Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues	

Resum

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la caracterització del procés de mort cel·lular en la isquèmia en els cardiomiòcits. En el nostre estudi hem demostrat que l'expressió de les principals proteïnes reguladores de la mort cel·lular dependent de caspases es reprimeix durant el desenvolupament cardíac. En correlació amb aquest fet hem observat que la mort cel·lular induïda per isquèmia és dependent de caspases als cardiomiòcits embrionals, mentre que els cardiomiòcits postmitòtics moren de forma independent de caspases. En el nostre treball també hem demostrat que Endonucleasa G (EndoG) és la principal nucleasa responsable de la degradació de l'ADN, i en particular del senyal positiu de TUNEL, als cardiomiòcits postnatsals durant la isquèmia, mentre que *Apoptosis-inducing Factor* (AIF) podria protegir la supervivència dels cardiomiòcits durant la reoxigenació. La rellevància d'ambdues molècules correlaciona amb els nostres resultats en què AIF i EndoG augmenten la seva expressió durant el desenvolupament cardíac. Per últim, hem determinat que BNIP3, membre de la família de Bcl2, controla el procés de degradació d'ADN dependent d'EndoG en la isquèmia cardíaca sense impedir l'alliberament d'aquesta proteïna del mitocondri

Fa més d'una dècada que es va suggerir per primera vegada la rellevància de la mort apoptòtica al cor en contraposició a la mort necròtica. Tot i que s'ha suggerit la implicació de la via apoptòtica dependent de receptors de mort, així com la via mitocondrial i, fins i tot s'ha descartat la implicació de caspases en la mort isquèmica, avui en dia encara es desconeixen molts dels mecanismes involucrats en aquests processos. En aquest context el nostre treball és rellevant perquè: descarta la implicació de les caspases en la mort cardíaca durant la isquèmia, identifica a Endonucleasa G com a un executor de mort durant la isquèmia cardíaca i identifica a BNIP3 com a proteïna mitocondrial que indueix aquest mecanisme de mort. Les nostres dades poden ajudar a interpretar la sortida de citocrom c i el senyal positiu de TUNEL, ja que hem determinat que Endonucleasa G origina el senyal de TUNEL en els cardiomiòcits i que la sortida de citocrom c no activa mort dependent de caspases en els cardiomiòcits postnatsals.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización del proceso de muerte celular en cardiomiocitos durante la isquemia. En nuestro estudio hemos demostrado que la expresión de las principales proteínas reguladoras de muerte celular dependiente de caspasas se reprime durante el desarrollo cardíaco. En correlación con este hecho hemos observado que la muerte celular inducida por isquemia es dependiente de caspasas en cardiomiocitos embrionales, mientras que los cardiomiocitos postmitóticos mueren de forma independiente de caspasas. En nuestro trabajo hemos demostrado también que Endonucleasa G (EndoG) es la principal nucleasa responsable de la degradación de ADN en los cardiomiocitos postnatales durante la isquemia, y en particular de la señal positiva de TUNEL, mientras que *Apoptosis-inducing factor* (AIF) podría proteger la supervivencia de los cardiomiocitos durante la reoxigenación. La relevancia de ambas moléculas correlaciona con nuestros resultados en los que EndoG y AIF aumentan su expresión durante el desarrollo cardíaco. Por último, hemos determinado que BNIP3, miembro de la familia de Bcl2, induce el proceso de degradación de ADN dependiente de EndoG durante la isquemia cardíaca sin impedir la salida de esta proteína de la mitocondria.

Hace más de una década que se sugirió por primera vez la relevancia de la muerte apoptótica en el corazón en contraposición a la muerte necrótica. A pesar de que se ha sugerido la implicación de la vía apoptótica dependiente de receptores de muerte, así como de la vía mitocondrial, e incluso se ha descartado la implicación de caspasas en la muerte isquémica, hoy en día aún se desconocen muchos de los mecanismos implicados en este proceso. Dentro de este contexto nuestro trabajo es relevante porque: descarta la implicación de las caspasas en la muerte cardíaca durante la isquemia, identifica a Endonucleasa G como a un ejecutor de muerte durante la isquemia cardíaca e identifica a BNIP3 como a una proteína mitocondrial que puede controlar este mecanismo de muerte. Nuestros datos pueden ayudar a interpretar la salida de citocromo c y la señal positiva de TUNEL, ya que hemos determinado que Endonucleasa G origina la señal de TUNEL en los cardiomiocitos y que la salida de citocromo c no activa muerte dependiente de caspasas en cardiomiocitos postnatales.

Our main objective has been the characterization of the cell death mechanism in cardiomyocytes under ischemic conditions. In our research we demonstrated that the whole caspase-dependent pathway is silenced during heart development. In correlation to these results, we showed that ischemia-induced cell death is caspase-dependent in embryonic cardiomyocytes, yet postmitotic cardiomyocytes die in a caspase-independent manner. Our work also disclosed that Endonuclease G (EndoG) is the main nuclease responsible for DNA degradation in postnatal cardiomyocytes and induces the TUNEL-positive labeling, while Apoptosis-Inducing Factor (AIF) plays a prosurvival role in cardiomyocytes during reoxygenation. The relevance of both molecules correlates with the observation that AIF and EndoG are upregulated during heart development contrary to the genes involved in caspase-dependent cell death. Finally, our results show that BNIP3, a pro-death Bcl2 family member, induces EndoG-dependent DNA degradation without preventing EndoG release from mitochondria during ischemia.

More than one decade ago, the relevance of apoptotic cell death was suggested in heart in opposition to necrotic cell death. Death receptors and the mitochondrial intrinsic pathway have been suggested to be involved in ischemia-induced cell death. Several authors have refused the implication of caspases in ischemic cell death. However most of the mechanisms involved in that process are still unknown. In that context our study is relevant because: it discards the involvement of caspases in ischemia-induced cardiac cell death, it identifies Endonuclease G as a cell death executor during cardiac ischemia, and it identifies BNIP3 as a mitochondrial protein controlling this cell death mechanism. Our data contribute to understand cytochrome c release and TUNEL-positive labeling, as we have determined that Endonuclease G produces TUNEL labeling in cardiomyocytes and that cytochrome c release doesn't activate caspase-dependent cell death in postmitotic cardiomyocytes.

Abreviaciones

ADN: Àcid desoxiribonucleic
ADP: Adenosine Diphosphate
ADS: Solució salina glucosada tamponada
AIF: Apoptosis Inducing Factor
ANT: adenine nucleotide translocator
Apaf-1: Apoptotic protease activating factor 1
ARC: Apoptosis repressor with CARD
ARN: Àcid ribonucleic
Atg5: autophagy-related 5
ATP: Adenosine Triphosphate
AU: Arbitrary Units
BH: Bcl2 homology
BIR: baculovirus IAP repeat
BNIP3: Bcl2 nineteen kD interacting protein 3
BSA: Albúmina de sèrum boví
CAD: Caspase-dependent DNase
CARD: Caspase-Activation Recruitment Domain
Caspase: Cystein Aspartate Protease
COX IV: Cytochrome c oxidase subunit IV
DD: Death Domain
DED: Death Effector Domain
DISC: Death Inducing Signalling Complex
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO: Dimetilsulfòxid
DNAsa I: ADN nucleasa de tipus I
DNAsa II: ADN nucleasa de tipus II
DTT: 1, 4-ditiotreitòl
EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid
EGTA: Ethylene glycol tetra acetic acid
EndoG: Endonucleasa G
ERK: extracellular-signal regulated kinase
Exosc5: Component 5 de l'exosoma
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
FBS_{hi}: Sèrum fetal boví inactivat per calor
FEN-1: flap endonuclease-1

Abreviacions

FLIP_L: FLICE-like inhibitor (FLICE és un dels noms que rep caspasa 8)

HIF-1: hypoxia inducible factor 1

HF: Fibroblasts cardíacs, Heart Fibroblasts

HS: Sèrum de cavall

Hsp60: Heat shock protein 60

HMWF: High Molecular Weight Fragmentation

IAP: inhibitor-of-apoptosis protein

ICAD: Inhibitor of CAD

IF: Immunofluorescència

IL: Interleukin

IMAGE: Integrated Molecular Analysis of Genome Expression

kb: kilobases

kDa: kiloDalton

KO: Knock out

LAMP-2: lysosome-associated membrane protein-2

LMWF: Low Molecular Weight Fragmentation

LDH: Lactat deshidrogenasa

MCP: Mort cel·lular programada

Mfn2: GTPasa mitofusina 2

MME: Membrana Mitocondrial Externa

MMI: Membrana Mitocondrial Interna

NCCD: Nomenclature Committee on Cell Death

NEAA: Non-essential Amino Acids, aminoàcids no essencials

NGF: nerve growth factor

Nix: Nip3-like protein X

OMI/HTRA2: high-temperature-requirement protein A2

PARP-1: Poly (ADP) ribose polymerase 1

pb: parells de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimerase Change Reaction

PEI: polietilenamina

PFA: Paraformaldehyd

PMME: permeabilització de la membrana mitocondrial externa

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PT: Permeabilitat de transició

PTB: polypyrimidine tract binding protein
PTM: porus de transició mitocondrial
PVDF: Polyvinylidene difluoride
RAIDD: RIP Associated ICH-1
RISC: RNA-inducing silencing complex
RT-PCR: Reacció de PCR acoblada a transcripció reversa d'ARN.
Scr: Scrambled
SD: Deprivació de sèrum. Serum Deprivation
SDS: sodium docecyl sulfate
SDS-PAGE: Gel d'electroforesi de poliacrilamida en SDS
S.E.: Desviació Estàndard
SF: Fibroblasts de pell. Skin Fibroblasts
shRNAi: short RNA interference
siRNA: small interfering RNA
Smac/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI
tBID: truncated BID
TAE: Tris Acetic EDTA buffer
TBE: Tris Boric EDTA buffer
TBS-T: Tris Buffered Saline-Tween
TcR: Receptor de cèl·lules T
TE: Tris EDTA buffer
TM: Domini transmembrana
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNFR-1: receptor-1 de TNF
Topo II: ADN topoisomerasa de tipus II
Tr: Tampó de reperfussió
TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL: Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
UNR: upstream of n-Ras
VDAC: voltage-dependent anion channel
WB: Western Blot
XIAP: X-link IAP

Introducció

1. MORT CEL·LULAR I MECANISMES IMPLICATS

La mort cel·lular és un procés fisiològic/patològic que condueix a l'eliminació de cèl·lules, i que té una funció especial en la homeòstasi dels teixits i en els estats patològics. La mort cel·lular en condicions fisiològiques es dona per un mecanisme genètic altament conservat anomenat mort cel·lular programada.

La mort cel·lular programada permet als organismes multicel·lulars un estret control del nombre de cèl·lules i de la mida dels teixits, protegint-se a sí mateixos d'un excés de cèl·lules que amenaci l'homeostasi de l'organisme.

El 1972, *Kerr et al.* van observar un tipus de mort cel·lular diferent de la clàssica mort necròtica (distorsió i degradació dels orgànuls i inflament cel·lular), que van anomenar apoptosi. Els canvis morfològics que defineixen l'apoptosi són arrodoniment de la cèl·lula, reducció del volum cel·lular (picnosi), condensació de la cromatina, fragmentació nuclear, pèrdua del potencial de membrana mitocondrial, manteniment dels orgànuls intactes, inflament de la membrana plasmàtica i manteniment de la integritat de membrana (Kerr et al., 1972).

El fenomen de mort cel·lular programada (MCP) no només involucra a la mort apoptòtica que acabem de descriure, també anomenada MCP de tipus I; sinó que la cèl·lula disposa d'altres vies que pot activar per tal d'induir la seva mort, com és la mort cel·lular autofàgica o MCP de tipus II. Aquest tipus de mort es caracteritza per la degradació de l'aparell de Golgi, dels poliribosomes i del reticle endoplasmàtic; i a diferència del que passa en l'apoptosi, el citoesquelet es preserva. Malgrat tot, aquests dos tipus de MCP no són excloents, i poden coexistir en una mateixa cèl·lula (Bursch et al., 2000).

El malfuncionament dels mecanismes de control de la MCP, per excés o per defecte, causa diferents tipus de patologies. La manca de MCP contribueix a l'oncogènesi i a la progressió del càncer, mentre que la MCP massiva està implicada en malalties infeccioses i desordres autoimmunitaris. La mort apoptòtica de cèl·lules postmitòtiques, com ara les neurones i els cardiomiòcits, causa malalties neurodegeneratives i cardíques (Thompson, 1995).

La nomenclatura dels diferents tipus de mort cel·lular ha estat bastant confusa, però recentment el Comitè de Nomenclatura en Mort Cel·lular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) ha determinat que el terme

Introducció

apoptosi encunyat el 1972 per Kerr segueix descrivint les característiques morfològiques de un tipus de mort, però no les característiques bioquímiques, i s'accepta que apoptosi es un tipus de mort que pot ocórrer amb o sense activació de caspases (Kroemer et al., 2005).

1.1 MECANISMES DE MORT DEPENDENTS DE CASPASES

Hi ha diferents mecanismes moleculars que poden conduir a la mort apoptòtica de la cèl·lula. Les vies clàssiques de mort són la via extrínseca o via dels receptors de mort i la via intrínseca o via mitocondrial; hi ha una tercera via, menys coneguda, que és l'apoptosi independent de caspases i que es pot donar per l'acció de diferents tipus de proteïnes.

1.1.1 Caspases

Les principals proteases que participen en la mort cel·lular durant les vies clàssiques de l'apoptosi pertanyen a la família de les caspases (*Cystein Aspartate proteases*), les quals són homòlogues entre elles i s'han conservat evolutivament des dels nemàtodes, hidres i insectes fins als humans (Hengartner, 2000).

Totes les caspases conegudes tenen una cisteïna al centre actiu, on la seva l'especificitat ve donada per 4 residus aminoacídics en el lloc de tall i que talla els substrats després de un residu d'àcid aspàrtic (Thornberry et al., 1997). Les caspases, igual que la majoria de proteases, es sintetitzen en forma de precursors inactius anomenats zimògens. Els zimògens de caspases o procaspases estan formats per tres subunitats: un prodomini N-terminal i dos dominis: un de llarg (p20) i un curt (p10). L'activació de les caspases passa per dos talls proteolítics que alliberen el prodomini i separen les dues subunitats, p10 i p20, que formen l'enzim madur i actiu (**Fig. 1**) (Earnshaw et al., 1999). Es coneixen almenys 14 caspases en mamífers, 11 de les quals s'han identificat també al genoma humà (Shi, 2002). El paper crític de les caspases en l'apoptosi es va descobrir en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* quan es va trobar que el gen *ced-3*, indispensable per a l'apoptosi, codifica per una cisteïna proteasa homòloga a les caspases de mamífers (Yuan et al., 1993).

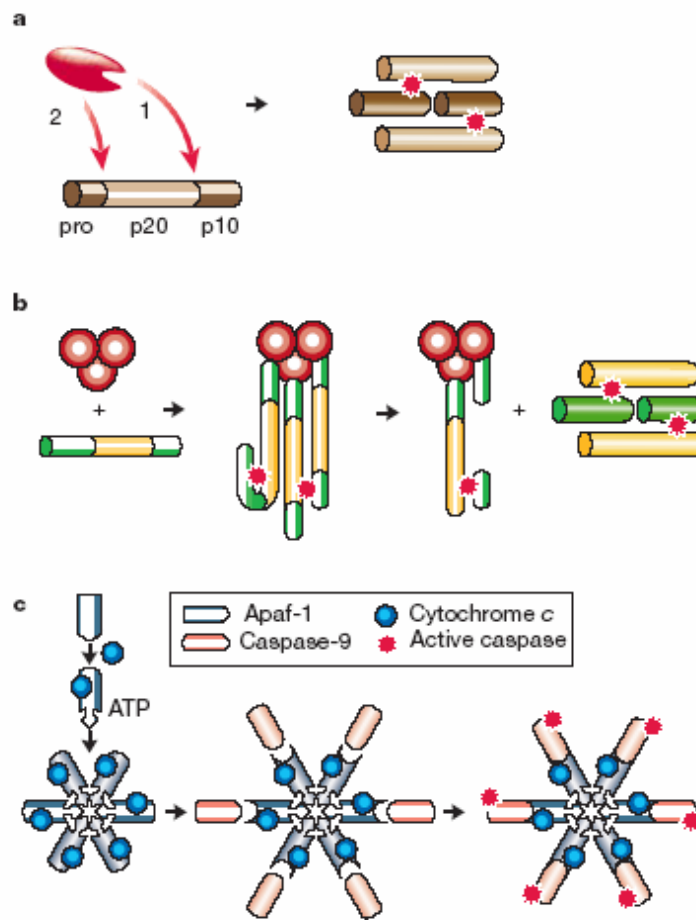


Figura 1. Mecanismes d'activació de les caspases. a) Tall proteolític per una caspasa per damunt de la via és efectiu i s'utilitza per a l'activació de les caspases efectores. b) Reclutament de múltiples molècules de procaspasa 8, que es mantenen juntes de manera que així s'activen. El mecanisme real és més complex que el que mostra l'esquema. c) Formació d'un holoenzim: l'oligomerització d'Apaf-1 per unió de citocrom c i ATP permet el reclutament de caspasa 9 dins el complex de l'apoptosoma. L'activació de caspasa 9 es dona per canvis conformacionals, no per proteòlisi. Origen: (Hengartner, 2000).

Existeixen diferents mètodes de classificació de les caspases: per la seva estructura, per la seva especificitat de tall i per la seva funció. Basant-nos en la longitud del prodomini N-terminal, les caspases es poden dividir en dos grups, les d'extrem N-terminal relativament llarg (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 i 12) i les d'extrem curt (3, 6, 7 i 14). Les caspases que tenen prodominis llargs poden contenir dominis d'interacció específics proteïna – proteïna que juguen un paper important en la seva activació, com ara el domini CARD (caspase-activation recruitment domain) en les caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 i 12 i el domini DED (death effector domain) en les

Introducció

caspses 8 i 10. Aquestes caspses s'autoactiven per proximitat (**Fig. 1**) en complexos multiproteïcs que recluten els prodominis llargs de les caspses, com són l'apoptosoma, el DISC (Death Inducing Signaling Complex), el PIDDosoma i els inflasomes que contenen caspasa-1 (**Fig. 2**) (Lamkanfi et al., 2007). Les caspses de prodomini curt no poden autoactivar-se (**Fig. 1**) i necessiten ser activades per maduració proteolítica duta a terme per caspses de prodomini llarg o per altres proteases (Lamkanfi et al., 2007).

Segons l'especificitat de tall trobem tres grups de caspses: el grup I (caspses 1, 4, 5, 11, 12 i 13), el grup II (caspses 2, 3, 7 i 14) i el grup III (caspses 6, 8, 9 i 10). D'aquesta classificació només cal destacar el grup I, que també es coneixen com a caspses inflammatòries, i que en el genoma humà només hi estan expressades les caspses 1, 4, 5 i 13 i en el de ratolí les caspses 1, 11 i 12 (Martinon and Tschopp, 2007).

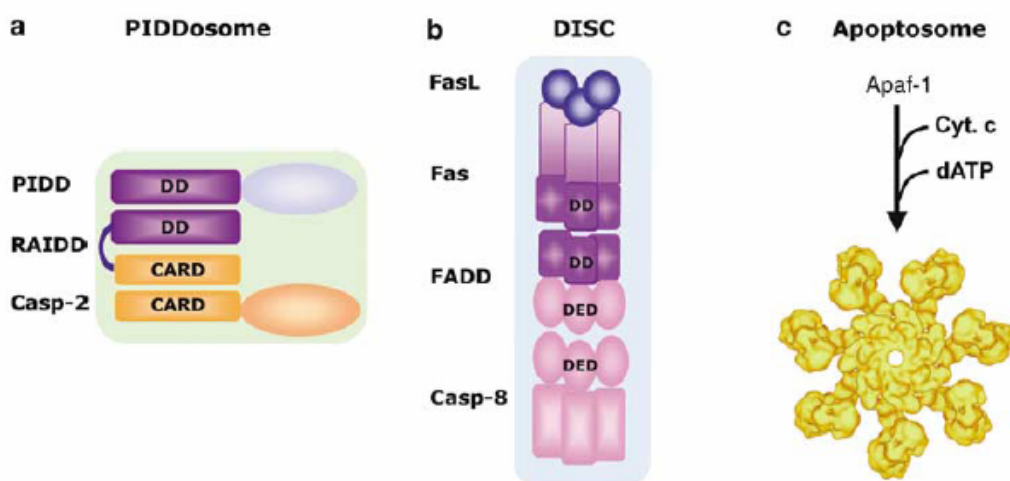


Figura 2. Complexes multiproteïcs d'activació de caspses. Els complexos multiproteïcs són els responsables de l'activació de les caspses iniciadores. a) El complex del PIDDosoma intervé en l'activació de caspasa 2 en mamífers, i conté almenys tres components, PIDD, RAIDD i caspasa 2 (Tinel and Tschopp, 2004). b) El complex DISC promou l'activació de caspasa 8, es forma després de la unió d'un lligand de mort al seu receptor, i conté FADD i caspasa 8 (o 10) (Kischkel et al., 1995). c) L'apoptosoma promou l'activació de caspasa 9 i està format per 7 molècules d'Apaf-1 unides a citocrom c en presència d'ATP (Zou et al., 1999). Origen: (Bao and Shi, 2007)

Per últim, les caspses també es poden classificar per la seva funció. Així doncs trobem les caspses apoptòtiques (**Fig. 3**) i les no-apoptòtiques. Dins les

caspases apoptòtiques podem distingir dos grups també, les caspases iniciadores (2, 8, 9 i 10), que són caspases de prodomini llarg i les que inicien el procés de mort, i les caspases efectores (3, 6, 7 i 14), de prodomini curt, que són els autèntics efectors apoptòtics, responsables de tallar i activar les molècules implicades en la mort cel·lular, per la qual cosa són anomenades també caspases executores. El fenomen apoptòtic requereix l'activació seqüencial de les caspases iniciadores i les efectores (Riedl and Shi, 2004).

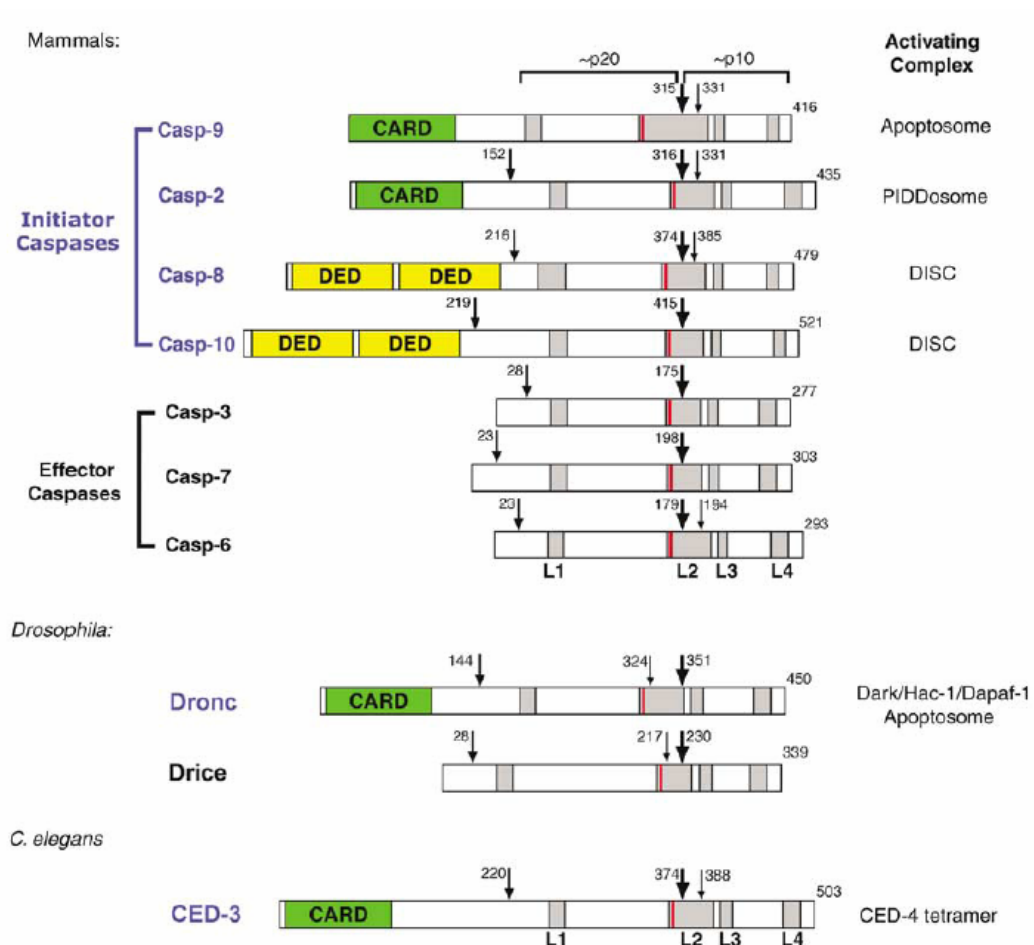
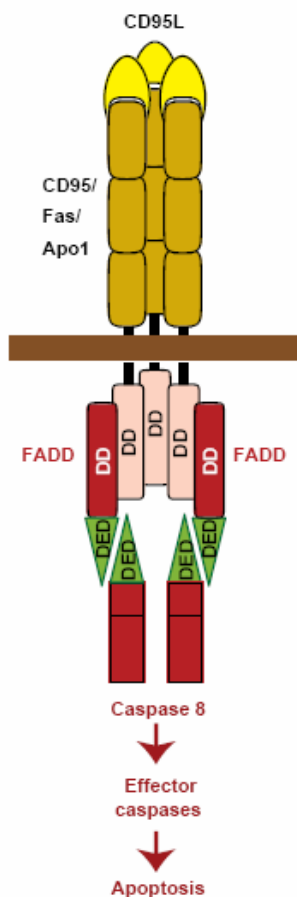


Figura 3. Caspases apoptòtiques. Dibuix a escala de sis caspases iniciadores i quatre caspases efectores de tres espècies diferents. La posició del primer tall dins la cadena (entre la subunitat gran i la petita) està marcat amb una fletxa gran, mentre que els tallats addicionals estan marcats amb fletxes més petites. Els prodominis de les caspases iniciadores contenen motius d'interacció homotípics, com ara CARD i DED. Els quatre bucles de la superfície, anomenats de L1 a L4, formen el centre actiu d'una caspasa. El residu de cisteïna que es troba al centre actiu es mostra com una línia vermella al principi del bucle L2. Les subunitats p20 i p10 juntes formen un monòmer de caspasa. Origen: (Bao and Shi, 2007).

1.1.2 Via extrínseca de l'apoptosi

La via extrínseca és responsable de l'eliminació de cèl·lules no desitjades durant el desenvolupament, la maduració del sistema immunitari i l'eliminació de cèl·lules tumorals per part del sistema immunitari. Aquesta via comença amb l'activació d'un dels receptors transmembranals de mort, que són receptors específics que detecten la presència de determinats senyals extracel·lulars (l·ligands) i que, en resposta, activen la maquinaria intracel·lular d'apoptosi. Els receptors de mort més coneguts són el receptor-1 de TNF (Tumor Necrosis Factor) (TNFR-1), el receptor FAS o CD95 (el seu l·ligand s'anomena FASL o CD95L) i els receptors 1 i 2 de TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (**Fig. 4**) (Ashkenazi and Dixit, 1998).



En resposta a la unió d'un l·ligand a la part extracel·lular del receptor, aquest forma microagregats a la superfície cel·lular, fet que permet el reclutament de la proteïna adaptadora FADD (Fas-associated protein with Death Domain) a l'extrem citosòlic del receptor per un mecanisme complex que implica unió entre diferents dominis de mort (DD, Death Domain) (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Al seu torn FADD recluta procaspasa 8 per interacció homofílica entre els seus respectius DEDs, formant un complex multiproteic anomenat DISC on s'activa la caspasa 8 iniciadora (**Fig. 4**).

Figura 4. Receptor de Mort. Via de senyalització d'apoptosi del receptor CD95. DD, domini de mort; DED, domini efector de mort. Origen: (Ashkenazi and Dixit, 1998).

La hipòtesi inicial de l'activació de caspasa 8 implicava un model d'inducció per proximitat, on una petita activitat caspasa residual en la procaspasa 8 promovia el tall en *trans* dels dímers de caspasa 8 reclutats junts al DISC, generant la forma canònica activa de caspasa 8, formada per dues molècules (Salvesen and Dixit, 1999).

Dades recents posen en dubte aquest mecanisme, ja que sembla que no és necessari el tall de procaspasa 8 per a la formació del centre actiu (Boatright et al., 2003; Donepudi et al., 2003). Més aviat es pensa que el processament de caspasa 8 dóna estabilitat al dímer generat durant la formació del DISC, i que el fet clau per a l'activació és la dimerització dels monòmers de caspasa 8. En la nova hipòtesi es manté el model d'inducció per proximitat però amb la funció de reclutar els monòmers i permetre la formació de dímers, i no pas pel reclutament de dímers preformats. Després de la dimerització, els dominis DED en posició N-terminal s'eliminen per proteòlisi, presumptament per permetre l'alliberament al citosol de la caspasa activada (Chang et al., 2003) (**Fig. 5**). Aquest mecanisme d'activació es basa en una propietat de caspasa 8 que havia passat desapercibuda: que en el seu estat inactiu és un monòmer. Actualment aquesta propietat s'ha demostrat tant en procaspasa 8 recombinant (Donepudi et al., 2003) com en el zimògen endogen (Boatright et al., 2003).

Un component addicional del mecanisme d'activació de caspasa 8 és la proteïna FLIP_L (FLICE-like inhibitor, FLICE és un dels noms amb el que es va batejar caspasa 8). FLIP_L és un homòleg de caspasa 8 però al que li manca la cisteïna del domini catalític, la qual cosa fa que FLIP_L no tingui activitat proteolítica (Irmiler et al., 1997; Shu et al., 1997). Hi ha hagut bastant controvèrsia sobre el paper proapoptòtic o antiapoptòtic de FLIP_L. *Chang et al.* aparentment han resolt la controvèrsia, ja que nivells baixos de FLIP_L (similars als que es troben en condicions normals a la cèl·lula) promouen l'activació de caspasa 8 al complex DISC; i només nivells elevats de FLIP_L (com es pot trobar en certs tumors) inhibeixen l'activació de caspasa 8 (**Fig. 6**) (Chang et al., 2002). Altres treballs han complementat aquest estudi revelant que FLIP_L pot formar heterodímers amb caspasa 8 que tenen activitat catalítica (Micheau et al., 2002), confirmant a més a més que el mecanisme d'activació de caspasa 8 és per dimerització.

Introducció

Un dels substrats de caspasa 8 és la proteïna proapoptòtica de la família de Bcl2 Bid, que un cop tallada (tBid, truncated Bid) transloca al mitocondri on pot induir la sortida de factors del mitocondri, activant així la via mitocondrial i reforçant el senyal extrínsec de mort (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

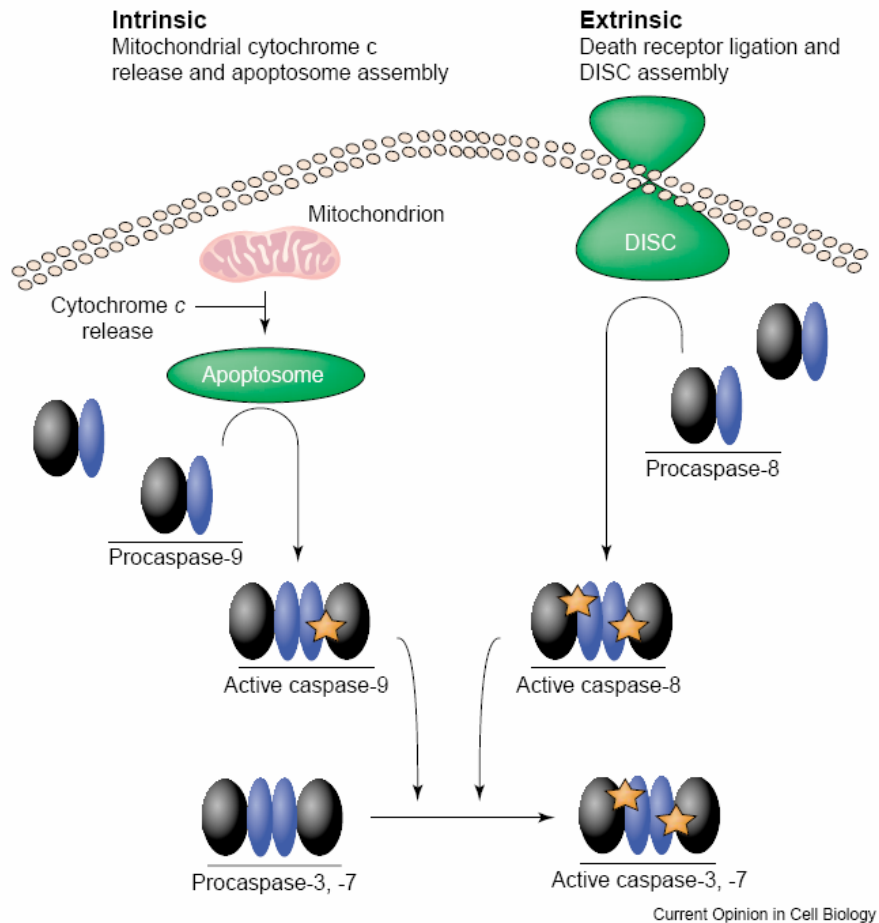


Figura 5. Activació de les caspases apicals. L'activació de les vies extrínseca o intrínseca porta a l'activació de les caspases iniciadores per dimerització en complexos multiproteïcs. En la via extrínseca el lloc d'activació de caspasa 8 és DISC, i en humans també de caspasa 10. Els centres actius estan representats per estrelles taronges. L'estimulació de la via intrínseca porta a l'activació de caspasa 9 a l'apoptosoma. En l'estructura cristal·lina de caspasa 9 s'ha vist que només presenta un centre actiu. No obstant, el nombre de centres actiu *in vivo* es desconeix. Un cop actives, les caspases iniciadores tallen i activen les caspases executores 3 i 7. Origen: (Boatright and Salvesen, 2003).

En contrast amb el mecanisme d'activació de les caspases iniciadores, els zimògens de les caspases executores 3 i 7 es troben al citosol en forma de dímer inactiu (**Fig. 5**) (Boatright et al., 2003). Les caspases efectores ja dimeritzades

s'activen per proteòlisi limitada en la cadena d'unió entre els dos dominis, dut a terme per una caspasa iniciadora. Així doncs, un cop s'ha activat caspasa 8 aquesta pot activar les caspases efectores per proteòlisi, que al seu torn inicien els esdeveniments que portaran a la mort apoptòtica de la cèl·lula, entre ells la degradació de l'ADN nuclear per CAD (Caspase-dependent DNase) o DFF40, que és una endonucleasa activada per caspases que degrada l'ADN nuclear, impedit la recuperació de la cèl·lula (Enari et al., 1998; Piotr Widlak, 2005).

1.1.3 Via intrínseca de l'apoptosi

La major part de les condicions que indueixen mort cel·lular en vertebrats es donen per la via mitocondrial de l'apoptosi (Green and Kroemer, 2004). En contraposició a la via extrínseca, que es dona en resposta a un grup especialitzat de senyals de mort, la via intrínseca transdueix una àmplia varietat d'estímuls intracel·lulars i extracel·lulars incloent la pèrdua d'adhesió, manca de factors tròfics o de supervivència, hipòxia, estrès oxidatiu, isquèmia - reperfussió i dany a l'ADN. En resposta a aquests estímuls de mort, el mitocondri pot esdevenir selectivament permeable per tal de permetre la sortida de citocrom c al citosol, que permetrà el reclutament i activació de la caspasa iniciadora de la via intrínseca, procaspasa 9, formant un complex multiproteic anomenat apoptosoma (Zou et al., 1999) que recluta procaspasa 9 per unió dels seus respectius dominis CARD en N-terminal (Li et al., 1997) (**Fig. 6**).

La formació de l'apoptosoma s'explica amb més detall en l'apartat 1.1.3.3, però breument consisteix en què la unió de citocrom c i ATP indueix l'oligomerització del cofactor Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), que recluta molècules de procaspasa 9 i resulta en la formació de l'apoptosoma. A pesar que caspasa 9 és un monòmer en concentracions citosòliques, l'estructura tridimensional del cristall de caspasa 9 revela que la forma activa és un dímer (Renatus et al., 2001), com també passa amb les caspases iniciadores de la via extrínseca (**Fig. 5**). Un cop caspasa 9 ha dimeritzat i és activa, pot tallar i activar les caspases executores 3 i 7, que iniciaran la cascada proteolítica que porta a la mort cel·lular.

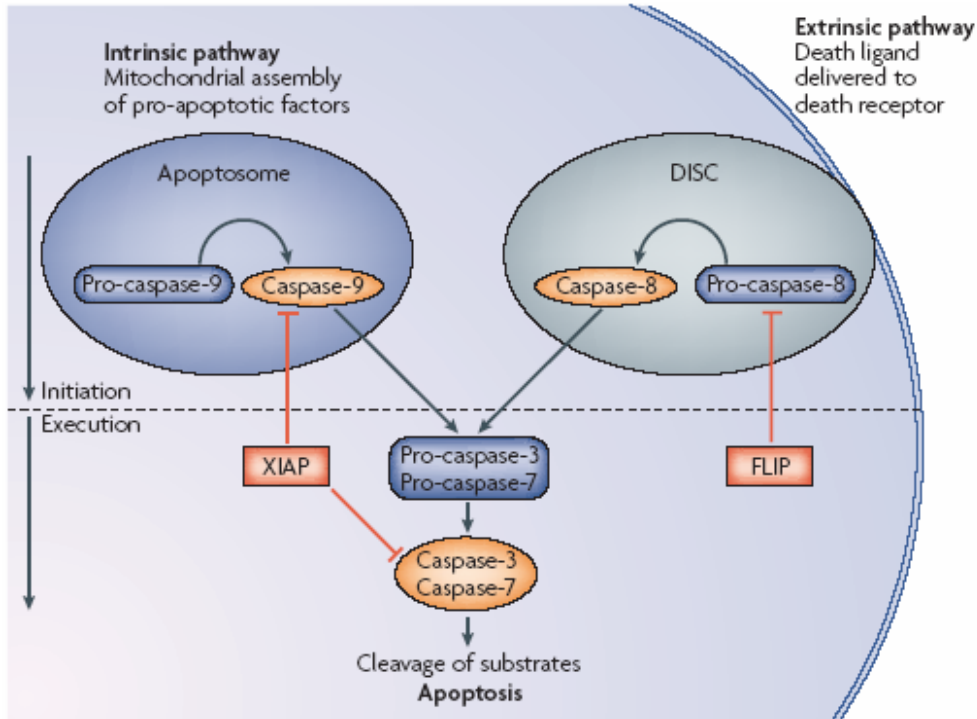


Figura 6. Esquema de la cascada proteolítica de les caspases, en la iniciació i execució de l'apoptosi. Tant la via extrínseca com la via intrínseca utilitzen principis relacionats per a detectar el senyal apoptòtic i executar l'apoptosi. En la via intrínseca un estímul apoptòtic porta a l'acoblament de l'apoptosoma, que activa la caspasa 9 iniciadora. En canvi, un senyal apoptòtic de la via extrínseca es transmet per la unió d'un lligand extracel·lular a un receptor transmembrana, portant a la formació del DISC, el qual és capaç d'activar la caspasa 8 iniciadora. Un cop activades, tant caspasa 8 com la 9 tallen les caspases executores 3 i 7, les quals representen el nivell executor de la cascada de caspases i porten a l'apoptosi de la cèl·lula condemnada. Es poden trobar reguladors negatius de la cascada de caspases en ambdós nivells. Mentre que FLIP bloqueja l'activació de caspasa 8 en el DISC, XIAP pot bloquejar tant la fase iniciadora, per inhibició de caspasa 9, com la fase executora, bloquejant les caspases 3 i 7. Origen: (Riedl and Salvesen, 2007)

Les dues vies, intrínseca i extrínseca, convergeixen a nivell de les caspases executores. L'activació i l'activitat de les caspases efectores 3 i 7, i també de la caspasa iniciadora 9 està inhibida per les proteïnes de la família de IAP, la més important de les quals és XIAP (**Fig. 6**). Alhora, aquestes proteïnes inhibidores estan inhibides per la proteïna Smac/DIABLO que és alliberada del mitocondri juntament amb citocrom c.

La permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME) es considera el "punt de no retorn" de la mort apoptòtica, ja que és responsable de l'activació de la cascada de senyalització apoptòtica en moltes vies de mort cel·lular

(Chipuk et al., 2006). El mecanisme pel qual es produeix la PMME està molt discutit, i actualment s'han proposat dos mecanismes que podrien actuar en diferents situacions. En el primer mecanisme les molècules proapoptòtiques de la família de Bcl2, Bax i Bak, formarien un canal a la membrana mitocondrial externa permetent l'alliberament de factors del mitocondri. Les proteïnes de la família de Bcl2 són els principals reguladors de la via intrínseca de l'apoptosi ja que regulen el procés de PMME a nivell del mitocondri, esdevenint així un punt crític per al control de la cascada de senyalització apoptòtica. El segon mecanisme implica la formació d'un porus de transició mitocondrial (PTM) a la membrana mitocondrial interna, permetent l'entrada de ions i aigua a la matriu mitocondrial i l'inflament de la membrana mitocondrial interna, que provoca la lisi de la membrana mitocondrial externa. Ambdós mecanismes seran revisats més endavant.

1.1.3.1 Proteïnes de la família de Bcl2

Els membres de la família de proteïnes de Bcl2 són importants reguladors de mort, tant proapoptòtics com antiapoptòtics, que actuen regulant la permeabilitat del mitocondri en la cascada de senyalització apoptòtica (Tsujimoto, 2003). Les proteïnes d'aquesta família comparteixen l'homologia de fins a 4 regions conservades en la seva seqüència, anomenades dominis d'homologia de Bcl2 (BH, Bcl2 homology) 1-4, que corresponen a les hèlixs- α que defineixen la seva estructura i funció (Adams and Cory, 1998). Moltes proteïnes de la família de Bcl2 també tenen una seqüència d'ancoratge en el seu l'extrem C-terminal, que els dirigeix principalment a la membrana mitocondrial externa, a la membrana del reticle endoplasmàtic i a l'embolcall nuclear extern (Krajewski et al., 1993; Akao et al., 1994). La família es pot dividir en tres subclasses principals, segons el nombre de dominis BH que comparteixen els seus membres (**Fig. 7**). La primera subclasse conté els membres antiapoptòtics, que conserven els quatre dominis BH1-4; els membres de la segona subclasse conserven només tres dels dominis, BH1-3, i tenen funció proapoptòtica; i els membres de la tercera subclasse també tenen funció proapoptòtica i només conserven el domini BH3, que és necessari per la seva funció apoptòtica (Chittenden et al., 1995b) i pel que també s'anomenen grup "BH3-only".

Introducció

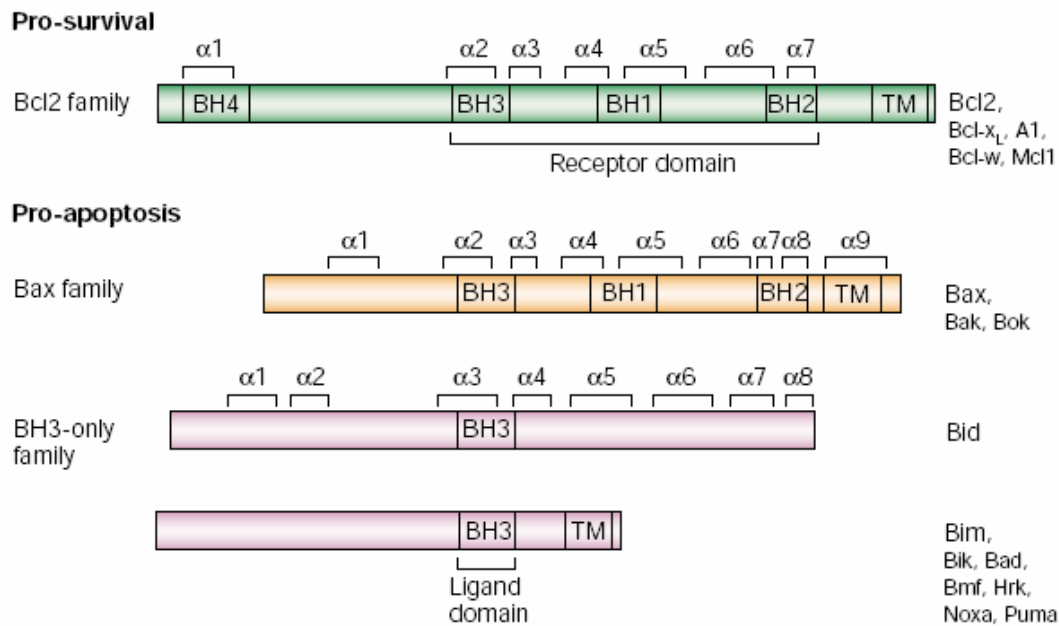


Figura 7. Tres subfamílies de proteïnes relacionades amb Bcl2. A l'esquema hi han marcadetes les hèlix α i també les quatre regions conservades entre els diferents membres de la família (BH1-4). Molts membres tenen un domini C-terminal hidrofòbic que els hi permet la unió a les membranes intracel·lulars, excepte A1 i moltes de les proteïnes BH3-only (Bad, Bid, Noxa, Bmf i Puma). TM, domini TransMembrana. Origen: (Cory and Adams, 2002)

a) Membres antiapoptòtics: Bcl2 i BclX_L

La categoria dels membres antiapoptòtics de la família de Bcl2, a part dels membres més coneguts que són Bcl2 (Pegoraro et al., 1984; Tsujimoto et al., 1985), BclX_L (Gonzalez-Garcia et al., 1994) i que revisarem amb més detall en aquest apartat, també inclou Mcl-1 (Kozopas et al., 1993), A1 (Chuang et al., 1998) i Bcl-W (Gibson et al., 1996) (**Fig. 7**).

Bcl2, la proteïna fundadora de la família, es va identificar originalment com a un protooncogen involucrat en la transposició cromosòmica del limfoma folicular humà (Bakhshi et al., 1985). El més notori del cas va ser que la seva sobreexpressió en cèl·lules limfoides, al contrari del que es sabia dels oncògens fins a llavors, promovia la supervivència cel·lular i no pas la seva proliferació (Vaux et al., 1988; McDonnell et al., 1989). Tant Bcl2 com BclX_L presenten una hèlix hidrofòbica a l'extrem C-terminal, que s'anomena domini transmembrana (TM) i que els permet ancorar-se a membranes (Chen-Levy and Cleary, 1990; Nguyen et al., 1993; Janiak et al., 1994; Kim et al., 1997). Bcl2 es pot localitzar a la membrana mitocondrial

externa, a la membrana del reticle endoplasmàtic i a l'embolcall nuclear (Krajewski et al., 1993; Givol et al., 1994; Lithgow et al., 1994), on teòricament pot segrestar les molècules proapoptòtiques de la mateixa forma en què ho fa a la membrana mitocondrial (**Fig. 8**). L'expressió constitutiva de Bcl2 en els fibroblasts cardíacs els confereix resistència a la mort cel·lular induïda per isquèmia, tal com resultats previs nostres en un model de cultiu cel·lular primari, que no s'inclouen en el sí d'aquesta tesi, han demostrat [(Mayorga et al., 2004) i ANNEX 1].

BclX_L, a diferència que Bcl2, presenta una seqüència particular de localització mitocondrial en la regió TM (Kaufmann et al., 2003). Així doncs, BclX_L actua específicament a nivell mitocondrial, mentre que Bcl2 pot actuar també a nivell de reticle endoplasmàtic. L'estructura del monòmer de BclX_L ha revelat que els dominis BH1, BH2 i BH3 es troben molt pròxims entre sí i que creen una butxaca hidrofòbica que pot allotjar el domini BH3 d'un membre proapoptòtic (**Fig. 8b**) (Sattler et al., 1997; Petros et al., 2000).

Bcl2 i BclX_L, a part de la seva funció antiapoptòtica, també actuen en el control del cicle cel·lular, on concretament tenen funció antiproliferativa, facilitant la entrada en fase G0 (Zinkel et al., 2006). Mcl-1 també podria tenir un paper antiproliferatiu en el control de cicle cel·lular (Fujise et al., 2000; Jamil et al., 2005), encara que la seva funció no està clara; mentre que a A1 no se li coneix cap paper en el cicle cel·lular (Gonzalez et al., 2003). Aquestes funcions, i la d'altres membres de la família de Bcl2, s'explicaran en més detall en l'apartat 1.1.5 de *funcions no apoptòtiques d'alguns efectors i reguladors de les vies de mort dependents de caspases*.

b) Membres proapoptòtics: Bax i Bak

Les proteïnes proapoptòtiques multidomini de la família de Bcl2, com Bax (Oltvai et al., 1993) i Bak (Chittenden et al., 1995a) (**Fig. 7**), participen en l'execució de la disfunció mitocondrial un cop han rebut senyals de mort. En cèl·lules viables aquestes proteïnes es troben en forma de monòmers. En resposta a una gran varietat d'estímuls de mort Bax inactiu, que es localitza al citosol o dèbilment unit a membranes, fa un canvi conformacional que li permet insertar-se profundament dins la membrana mitocondrial externa (MME) en forma de homooligòmer (**Fig. 8**)

Introducció

(Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998; Eskes et al., 2000; Lalier et al., 2007). Bak inactiu es troba al mitocondri on, en resposta als senyals de mort, fa un canvi conformacional al·lostèric que inclou la seva homooligomerització (Griffiths et al., 1999; Wei et al., 2000). Els ratolins doble *knock out* (DKO) per Bax i Bak tenen una elevada mortalitat perinatal, i presenten anomalies en el desenvolupament, com ara membranes interdigitals, no perforació del canal vaginal, i acumulació de cèl·lules al sistema nerviós central i al sistema hematopoietic, mentre que els ratolins *knock out* únicament per Bax o per Bak presenten un fenotip molt més benèvol, suggerint que Bax i Bak tenen papers sobreposats en la regulació de la MCP en mamífers, i en l'homeostasi tissular (Lindsten et al., 2000). Les cèl·lules deficientes en Bax i Bak són resistents a una gran varietat dels estímuls apoptòtics que actuen afectant la funció mitocondrial: estaurosporina, radiació ultravioleta, deprivació de factors de creixement i estrès de reticle endoplasmàtic (Wei et al., 2001). El nivell d'expressió de Bax i Bak varia segons el teixit i l'estadi del desenvolupament en la rata, en el cor es perd l'expressió d'ambdós en l'edat adulta [(Zhang et al., 2007a) i ANNEX 3].

Bax i Bak, sota un estímulo apoptòtic, canvien la seva localització subcel·lular, concentrant-se als llocs d'escissió mitocondrial, on col·localitzen amb proteïnes relacionades amb la fusió i fissió mitocondrial (Karbowski et al., 2004). Estudis recents han demostrat que Bax i Bak, en cèl·lules sanes que no estan induint apoptosi, són necessaris per al correcte funcionament dels mecanismes de fusió i fissió mitocondrial. Les cèl·lules Bax/Bak DKO presenten mitocondris més petits, amb una xarxa de interconnexió mitocondrial reduïda i amb una menor freqüència de fusió. A pesar dels defectes en la seva morfologia mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial i la concentració d'ATP no es veuen afectades en les cèl·lules deficientes per Bax i Bak (Karbowski et al., 2006). A més d'aquest paper en la morfogènesi mitocondrial, també s'ha proposat que Bax participa en el control de cicle cel·lular, ja que les cèl·lules T transgèniques per Bax són més grans i presenten activació de cdk2, just al contrari que el que s'observa en les cèl·lules T transgèniques per Bcl2 (Gil-Gomez et al., 1998; Cheng et al., 2004); així doncs, mentre que Bcl2 és antiapoptòtic i antiproliferatiu, Bax té funció proapoptòtica i proliferativa.

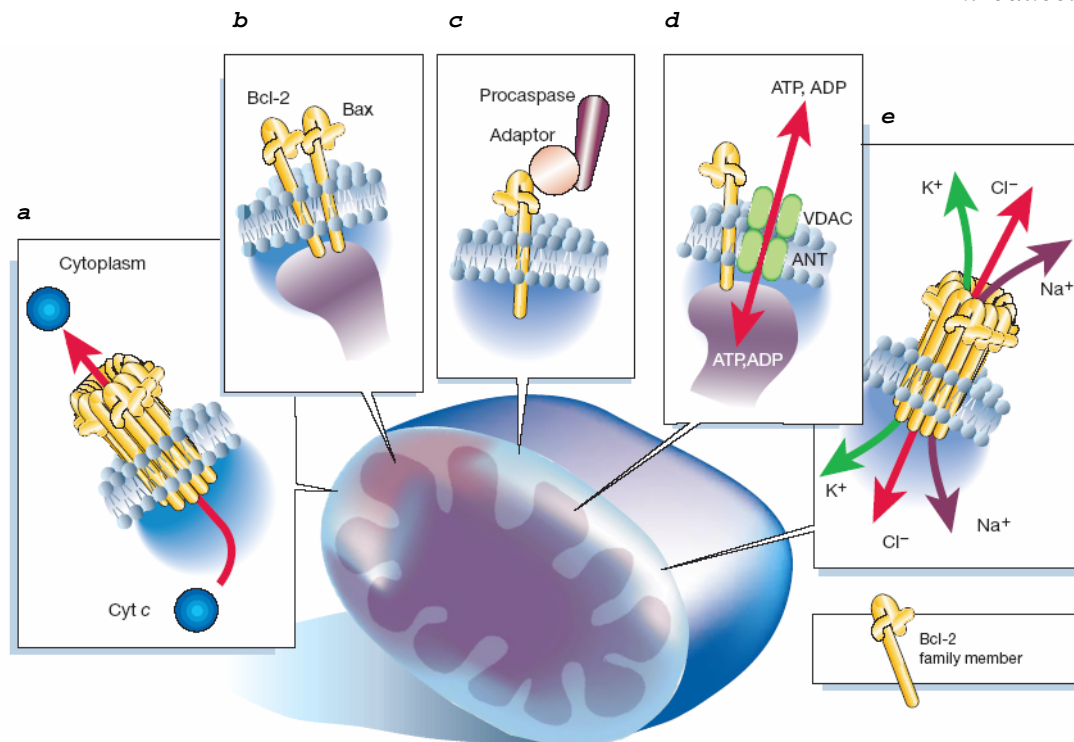


Figura 8. Possibles mecanismes d'acció dels membres de la família de Bcl2. a) Formació d'un porus, a través del qual citocrom c i altres proteïnes intermembranals poden escapar. b) Formació d'heterodímers entre els membres pro i antiapoptòtics de la família, gràcies a la interacció dels dominis BH3. c) Regulació directa de les caspases a través d'una proteïna adaptadora, tal com s'ha descrit en *C. elegans*. d) Interacció amb altres proteïnes mitocondrials, com ara VDAC i ANT, per regular l'obertura del porus de transició mitocondrial (PTM). e) Oligomerització per formar un canal iònic poc selectiu. Adaptat de (Hengartner, 2000).

c) Membres BH3-only de la família de Bcl2

Les molècules BH3-only de la família de Bcl2, on s'hi inclouen Bid, Noxa, Puma, Bik, Bmf, Bim i Bad, i també BNip3 i Nix (**Fig. 7**), transmeten i modulen molts senyals citotòxics o programats en el desenvolupament, i tenen funcions en el desenvolupament, la homeòstasi de teixits, la supressió de tumors i el sistema immunitari. Normalment són regulades per transcripció i/o mecanismes de control post-transcripcionals (Willis and Adams, 2005). Al activar-se, s'uneixen a membres de la família de Bcl2, permetent l'alliberament de Bax i Bak, que desencadenaran el mecanisme de mort apoptòtica. Les molècules BH3-only no poden induir mort cel·lular en absència de Bax i Bak (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001), el que porta a pensar que la seva funció de mort està situada en la mateixa via de senyalització, per damunt de l'acció de Bax i Bak.

Introducció

En condicions normals, les proteïnes BH3-only estan controlades per diversos mecanismes (**Fig. 9**). Bim i Bmf són segrestats per unió a cadenes lleugeres de dineïna (DLC, dynein light chain), que es troben associades amb els microtúbuls (Bim) i amb el citoesquelet d'actina (Bmf) (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001). Bad, un cop fosforil·lat per quinases com Akt i la proteïna quinasa A, s'uneix a les proteïnes de suport 14-3-3 (Zha et al., 1996), mentre que Bid és relativament inactiu fins que és tallat proteolíticament (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Altres BH3-only, com són Noxa i Puma, són controlats principalment a nivell transcripcional. (Oda et al., 2000; Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001)

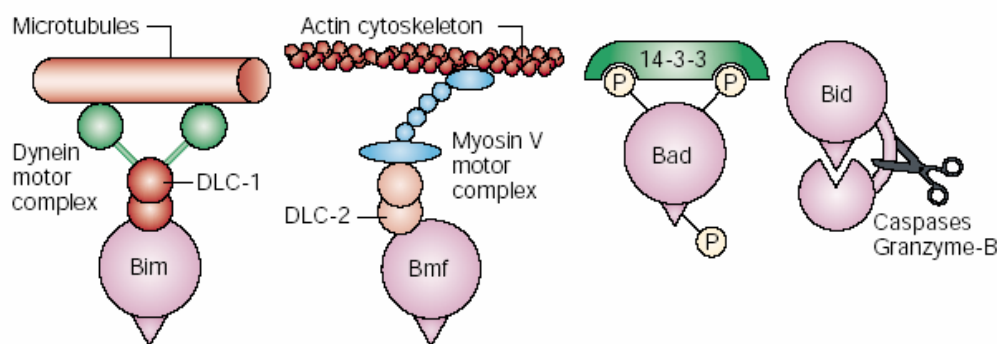


Figura 9. Diverses formes de regulació post-transcripcional de les proteïnes BH3-only. Bim i Bmf es troben segrestats, respectivament, als microtúbuls i fibres d'actina, per interacció amb DLC (dynein light chain). Bad fosforil·lat es troba unit a les proteïnes de suport 14-3-3. Bid es sintetitza com a precursor i necessita d'un tall proteolític per ser activa. El triangle representa el domini BH3 (Cory and Adams, 2002).

El mecanisme pel qual les proteïnes BH3-only promouen la mort cel·lular és un tema actual de debat (Galonek and Hardwick, 2006), que es pot separar en dues idees principals: un model directe o jeràrquic, i un model indirecte o de desplaçament.

Kim et al. han aportat fortes evidències que recolzen el *model jeràrquic* (**Fig. 10a**) (Letai et al., 2002), en el qual les proteïnes BH3-only es divideixen en dos grups, depenent del punt en la jerarquia en la què intervenen (Kim et al., 2006). Els components d'un grup de BH3-only, que inclou Bad, Noxa, Bik, Bmf i BNIP3 i que s'anomenen *inactivadors* o *sensibilitzadors*, s'uneixen directament a les proteïnes antiapoptòtiques, causant l'alliberament de les proteïnes proapoptòtiques que hi

havia unides. Aquestes proteïnes proapoptòtiques que es troben unides als membres antiapoptòtics de la família, són justament l'altre grup, anomenades proteïnes BH3-only *activadores*, i que inclou tBid, Bim i Puma. Ja es sabia que la proteïna Bid s'uneix tant a les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak (Wei et al., 2000) com a les antiapoptòtiques Bcl2 i BclX_L (Wang et al., 1996). *Kim et al.* han demostrat que Bim i Puma també poden unir-se directament a Bax i Bak i promoure l'alliberament de citocrom c (Kim et al., 2006).

En el *model de desplaçament* totes les proteïnes BH3-only promouen la mort unint-se, i així inactivant, a les molècules antiapoptòtiques de la família de Bcl2, alliberant d'aquesta manera a Bax i Bak que podran induir la mort cel·lular (**Fig. 10b**) (Chen et al., 2005; Willis et al., 2005). Estudis recents mostren que les proteïnes sensibilitzadores Bad i Noxa poden promoure apoptosi a través de Bax i Bak, sense que es detecti associació de Bax i Bak a les proteïnes BH3-only activadores que proposa el model jeràrquic (Bim, Bid i Puma), fins i tot en cèl·lules doble *knock out* per Bim i Bid, i amb l'expressió de Puma reduïda (Willis et al., 2007). Aquests resultats semblen indicar que les proteïnes BH3-only indueixen mort primordialment a través de la unió a les proteïnes antiapoptòtiques que retenen Bax i Bak i no per unió directe a aquests.

Així doncs, la controvèrsia sobre quin mecanisme està implicat en l'activació de la mort cel·lular per part de les proteïnes BH3-only continua.

Nix i BNip3 són dues molècules proapoptòtiques de la família de Bcl2 que comparteixen un alt grau d'homologia, que es localitzen al mitocondri i que a més a més s'ha postulat que tenen estructura i funcions semblants (Chen et al., 1997; Chen et al., 1999; Bruick, 2000).

BNip3 es va identificar originalment com a una proteïna que s'unia a E1B 19K i a Bcl-2 (Nip3, nineteen kD interacting protein 3) (Chen et al., 1997). En concentracions normals d'oxigen la majoria de teixits, inclòs el cor, no presenten nivells detectables de BNip3 (Bruick, 2000; Vande Velde et al., 2000), però durant la hipòxia s'activa la transcripció de BNip3 a través del lloc d'unió de HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) en 5' del promotor (Bruick, 2000; Guo et al., 2001). La funció proapoptòtica de BNip3 es diferencia de la d'altres membres BH3-only perquè no actua a través de l'heterodimerització dels dominis BH3 amb les molècules

Introducció

antiapoptòtiques Bcl2/BclX_L. En canvi, l'ancoratge a membrana és clau per a la heterodimerització amb Bcl2, fins i tot si artificialment es redirigeix BNIP3 a altres membranes no mitocondrials (Ray et al., 2000).

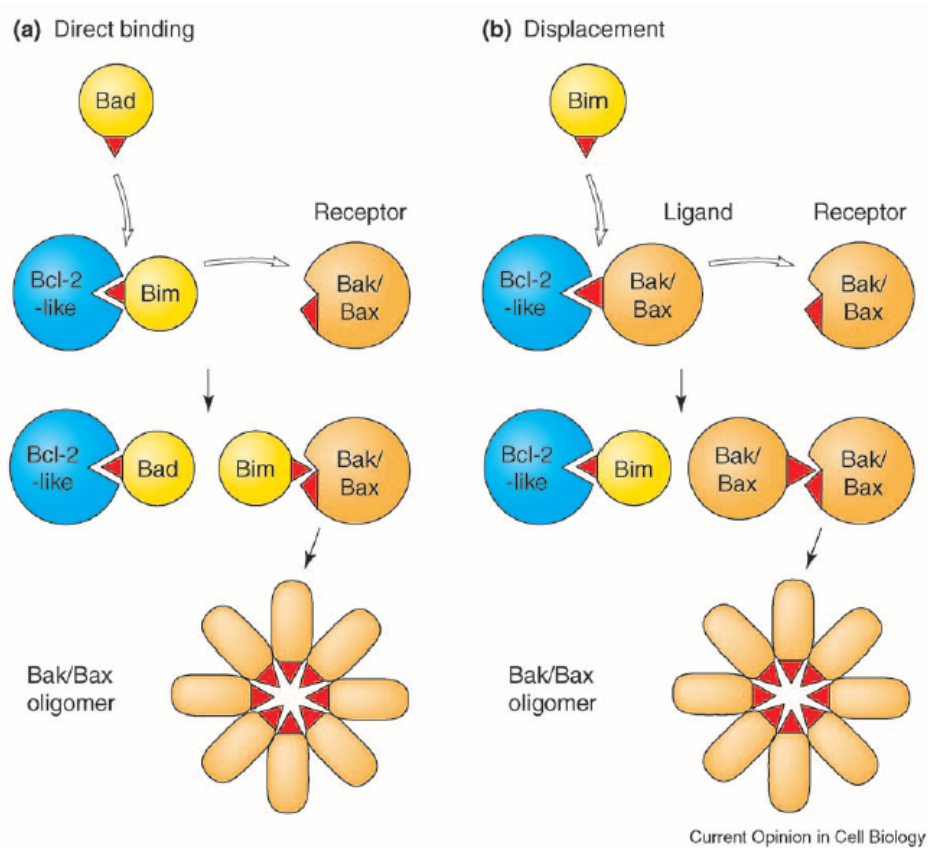


Figura 10. Models dels mecanisme d'activació de Bax i Bak per part de les BH3-only. a) Model d'unió directe. Les proteïnes BH3-only poden ser *sensibilitzadores*, per exemple Bad, que només s'uneixen a les proteïnes antiapoptòtiques, o *activadores*, tBid, Bim i Puma, que també poden unir-se a Bax i Bak. Els sensibilitzadors alliberen els activadors de les molècules antiapoptòtiques de la família de Bcl2 que els tenen segrestats, permetent que aquests s'uneixin directament a Bax (o Bak) i indueixin mort cel·lular (Letai et al., 2002; Kim et al., 2006). b) Model de desplaçament. Les proteïnes BH3-only només s'uneixen directament a les molècules antiapoptòtiques de la família de Bcl-2, promovent l'activació de Bax i Bak de forma indirecta, per desplaçament de les formes actives de Bax i Bak de les proteïnes antiapoptòtiques de Bcl2 que els tenen segrestats. Per a l'activació de Bak, les proteïnes BH3-only han de desplaçar Mcl-1 i BclX_L, però no Bcl2, que no s'uneix a Bak (Willis et al., 2005). Origen: (Willis and Adams, 2005).

Nix, també conegut com a BNip3L (BNip-like), es va identificar com a homòleg de BNip3 i està expressant constitutivament a molts teixits, inclòs el cor

(Matsushima et al., 1998; Chen et al., 1999). Encara que ha estat publicat Nix és induïble per hipòxia (Sowter et al., 2001), estudis recents han demostrat diferències en els promotors de BNip3 i Nix, que fan que BNip3 sigui induïble per isquèmia mentre que Nix té un promotor induïble sota estímuls hipertròfics (Galvez et al., 2006). Nix ha estat implicat en la supressió de tumors dependent de p53 (Passer et al., 2003).

1.1.3.2 Paper del mitocondri en la via de mort intrínseca

Els mitocondris són els orgànuls que tenen com a funció principal l'aportació d'ATP a la cèl·lula a través de la fosforil·lació oxidativa. L'oxidació del piruvat, la β -oxidació dels àcids grassos, l'oxidació dels aminoàcids i el cicle de Krebs tenen lloc a la matriu mitocondrial. La cadena de transport electrònic i la fosforil·lació oxidativa tenen lloc a les crestes de la membrana mitocondrial interna. La fosforil·lació oxidativa es dona gràcies a la diferència de potencial electroquímic de protons, creat per la cadena de transport electrònic entre la matriu mitocondrial i l'espai intermembranal. Aquesta diferència de potencial es manté gràcies a que la membrana mitocondrial interna té una permeabilitat intrínseca baixa, i a un grup de canals i transportadors que regulen el flux mitocondrial de ions i molècules. La baixa permeabilitat de la membrana mitocondrial interna també és vital per al control de les concentracions citosòliques de Ca^{2+} . El manteniment del gradient de protons, i d'altres ions i molècules, entre ambdós compartiments és crucial per al bon funcionament mitocondrial (Mathews and Holde, 1998).

A part de la seva funció energètica, els mitocondris també tenen una funció molt important en la mort cel·lular apoptòtica, ja que contenen un potent còctel de proteïnes proapoptòtiques. D'aquestes proteïnes una de les més rellevant és citocrom c, que dins del mitocondri té funció de donador d'electrons en la fosforil·lació oxidativa, però que sota un estímul apoptòtic és alliberat al citosol on passa a ser un dels components requerits (juntament amb la proteïna adaptadora Apaf-1) per a l'activació de caspasa 9 (Li et al., 1997). A més a més de citocrom c, que promou l'activació de les caspases, hi ha altres proteïnes proapoptòtiques que també s'alliberen al citosol des de l'espai intermembrana mitocondrial i que indueixen mort cel·lular independent de caspases. Aquestes proteïnes són AIF (Apoptosis Inducing

Introducció

Factor), Endonucleasa G i OMI/HTRA2 (high-temperature-requirement protein A2), de les quals parlarem en l'apartat 1.2 de vies de mort independents de caspases. Així doncs, si per alguna raó la cèl·lula no pot induir activació de caspases, els mediadors de mort apoptòtica independent de caspases assegurarien que la mort cel·lular prossegueixi (Chipuk and Green, 2005).

Al mitocondri hi convergeixen tant nombroses molècules de transducció de senyal proapoptòtic com variats estímuls patològics per tal d'induir permeabilització de la membrana mitocondrial externa, PMME. Aquest fet porta a l'alliberament de proteïnes que es troben al espai mitocondrial intermembrana, que poden induir mort cel·lular per tres mecanismes generals: activació de caspases, alliberament de molècules involucrades en la mort independent de caspases i pèrdua de les funcions mitocondrials essencials per la supervivència cel·lular (**Fig. 11a**) (Green and Kroemer, 2004). Els mecanismes que porten a l'alliberament al citosol de proteïnes de l'espai intermembrana del mitocondri són objecte d'un intens debat, però el que està clar és que moltes proteïnes poden regular aquest procés. Recentment s'ha elaborat una distinció formal entre dues classes de mecanismes de PMME (Kroemer et al., 2007), reflectint la separació històrica entre ambdós processos, en un la PMME es dona per l'acció dels membres de la família de proteïnes de Bcl2 i en l'altre per la permeabilitat de transició, que involucra la formació del porus de transició mitocondrial, PTM. Cada un dels mecanismes podria funcionar sota circumstàncies diferents, i mentre que el primer involucra només a la membrana mitocondrial externa, el segon també involucra a la membrana mitocondrial interna.

a) Permeabilització directa de la membrana externa

En aquest tipus de mecanisme per la PMME no hi té un paper rellevant la membrana mitocondrial interna i s'ha proposat que depèn de l'acció dels membres de la família de proteïnes de Bcl2, que actuen directament sobre la membrana mitocondrial externa (MME) (Gross et al., 1999; Vander Heiden and Thompson, 1999; Kuwana and Newmeyer, 2003). Els membres antiapoptòtics de la família de Bcl2 principalment resideixen a la MME, on tenen funció de protegir el mitocondri de la PMME, mentre que varis membres proapoptòtics la promouen. En cèl·lules sanes, la proteïna proapoptòtica Bak es troba associada a la membrana externa

mentre que Bax resideix al citosol. Aquest mecanisme postula que l'oligomerització de Bax o Bak genera porus que permeten l'alliberament de citocrom c i altres proteïnes proapoptòtiques (**Fig. 11b**). Els arguments que donen suport a aquesta hipòtesi són que l'estructura de les molècules de la família de Bcl2 és similar a la de les hèlixs formadores de porus de toxines bacterianes, i que Bax pot formar canals artificials en membranes i alliberar citocrom c de liposomes, on s'observen complexos que contenen Bax i Bak (Pavlov et al., 2001).

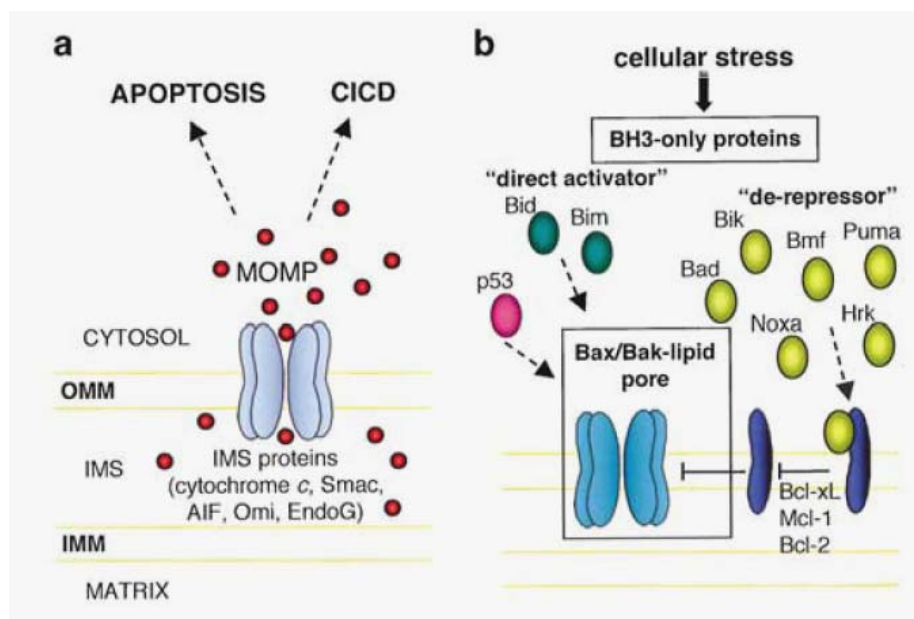


Figura 11. a) Representació esquemàtica de la PMME. Diferents tipus d'estress cel·lular activen la via mitocondrial induint la formació de porus en la membrana mitocondrial externa (MME). La permeabilització de la MME permet l'alliberament de nombroses proteïnes de l'espai intermembrana, el que resulta en l'activació d'apoptosi, amb o sense activació de caspases. b) Model de porus lipídics BAX/BAK. L'activació directa per part de les proteïnes BH3-only o de p53 induïxen a BAX o BAK a formar porus a la MME. Les proteïnes Bcl2, BclX_L i Mcl-1 poden bloquejar aquest procés a la MME, que al seu torn són regulades per les proteïnes proapoptòtiques BH3-only "sensibilitzadores" o que inhibeixen la repressió. Origen: (Chipuk et al., 2006)

Tal com ja s'ha mencionat, Bax en condicions fisiològiques és citosòlic però, quan s'indueix mort apoptòtica Bax s'inserta dins de la MME (Wolter et al., 1997), on pot formar porus per oligomerització, tot sol o associat amb altres membres proapoptòtics de la família, com ara Bak o tBid (Bid truncat) (**Fig. 11b**) (Kuwana et al., 2002). Aquest mecanisme requereix la relocalització de Bax al mitocondri, ja que

Introducció

si es reté Bax al citosol s'evita l'apoptosi i el dany mitocondrial (Sawada et al., 2003). De fet, s'ha proposat que Bax i Bak estan units, i així inactivats, a les proteïnes mitocondrials de la membrana externa VDAC1 (Kroemer et al., 2007) i VDAC2 (Cheng et al., 2003), respectivament (**Fig. 12b**). L'arribada d'un estímul apoptòtic activa les proteïnes proapoptòtiques BH3-only, que poden promoure la mort apoptòtica a través de l'alliberament de Bax i Bak de les proteïnes que els mantenen segrestats i inactius, encara que el mecanisme pel qual actuen les molècules BH3-only no està clar i és un tema candent de debat (revisat a l'apartat 1.1.3.1c) (Willis and Adams, 2005; Kim et al., 2006).

El mecanisme pel qual es formen els porus a la MME es relaciona amb un canvi conformacional de Bax o Bak (exposant els seus dominis N-terminal), que promou la seva inserció total a les membranes mitocondrials en forma d'homooligòmers i la formació d'un porus gegant permeable a proteïnes (Kuwana et al., 2002). Es sap que grans oligòmers de Bax s'organitzen en *clusters* prop del mitocondri poc temps després de la seva translocació al mitocondri (Nechushtan et al., 2001). Bak col·localitza en aquests clusters, però no d'altres membres de la família com són Bid i Bad. El mecanisme de permeabilització de la membrana a través de l'activació de Bax pot ser activat directament per Bid (Kuwana et al., 2002); per la proteïna p53, tot i que no té domini BH3 (Chipuk et al., 2004); i per Bim (Kuwana et al., 2005).

b) Permeabilitat de transició de la membrana interna

En el segon tipus de mecanisme s'ha postulat que la PMME depèn tant de la membrana mitocondrial interna (MMI) com de la MME i es basa en el fet que la regulació del flux de ions a través de la MMI és essencial, ja que la conservació de l'energia en forma de diferència de potencial electroquímico de protons s'utilitza per dirigir cada procés energètic al mitocondri (Bernardi et al., 1999). En aquest mecanisme de permeabilització de la MME es produeix un augment de la permeabilitat mitocondrial, anomenada *permeabilitat de transició* (PT), que és deguda a la formació d'un complex de proteïnes a la MMI anomenat porus de transició mitocondrial (PTM) (**Fig. 12a**). El complex proteic del PTM pot presentar diferents estats d'obertura, que van des d'una conformació de baixa conductància,

caracteritzada per una permeabilitat molt limitada, a un estat d'alta conductància, que permet el pas de soluts i molècules de fins a un pes molecular de 1,5kDa (Zoratti and Szabo, 1995). En cèl·lules sanes, l'obertura del PTM probablement té una cinètica ràpida de fluctuació entre l'estat obert i el tancat (Petronilli et al., 1999). L'activació del PTM *in vitro* provoca l'inflament passiu de la MMI degut a un flux d'aigua cap a l'interior del mitocondri per un fenomen osmòtic, causat per l'alta concentració de proteïnes de la matriu mitocondrial, que resulta en la lisi de la MME, provocant l'alliberament de les proteïnes de l'espai intermembrana mitocondrial al citosol (Crompton et al., 2002). El fenomen de la permeabilitat de transició té conseqüències nefastes per a la funcionalitat mitocondrial, ja que resulta en el col·lapse del potencial de membrana de la MMI, necessari per a la formació d'ATP en la fosforil·lació oxidativa i per al funcionament de la cadena de transport electrònic.

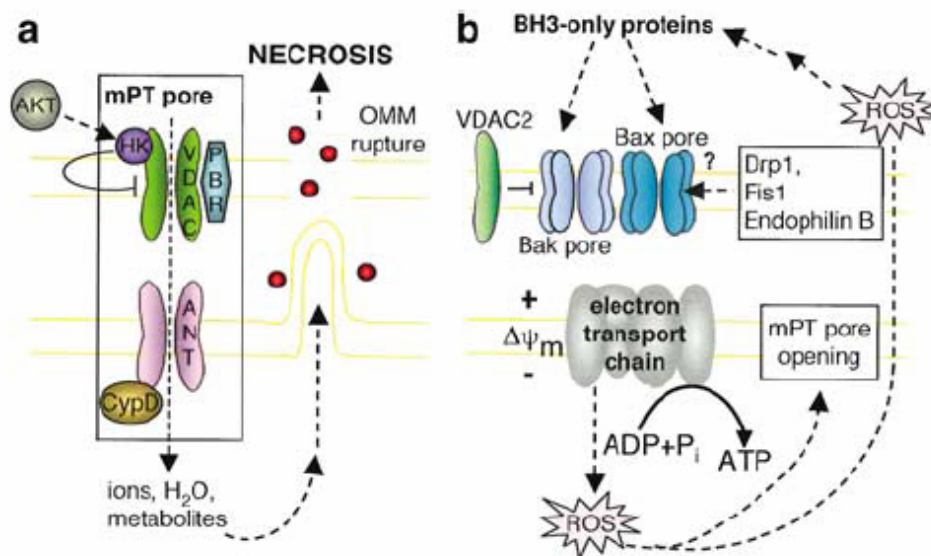


Figura 12. a) Representació esquemàtica del model de PTM (mPT al esquema). L'hipotètic porus de transició mitocondrial està format per VDAC, ANT, ciclofilina D i nombroses altres proteïnes. L'obertura del porus permet l'entrada d'aigua i de ions dins la matriu, induint l'inflament i la ruptura de la MME i que, molt probablement, resulta en necrosi. S'ha suggerit que varies proteïnes regulen el PTM, incloent l'hexoquinasa (HK) i el PBR. b) S'han suggerit altres proteïnes que regulen la PMME, específicament la formació del porus de BAX (o BAK) com ara VDAC2 i proteïnes que regulen la fissió i fusió mitocondrial. A més a més, alguns components mitocondrials poden induir PMME independentment, incloent la producció de ROS (radicals lliures d'oxigen) la cadena de transport mitocondrial, els quals poden causar obertura del PTM, però que igualment podrien induir apoptosi per activació de proteïnes BH3-only al citoplasma. Origen: (Chipuk et al., 2006)

Introducció

La composició molecular del PTM és un tema de debat. Les membranes mitocondrials interna i externa interaccionen en regions especialitzades anomenades “llocs de contacte”, que són rics en la proteïna translocadora d’adenina (ANT, adenine nucleotide translocator) a la membrana mitocondrial interna i en canals d’anions dependents de voltatge (VDAC, voltage-dependent anion channel) a la membrana mitocondrial externa, units a l’hexoquinasa I citosòlica. Així doncs, el model hipotètic de PTM (**Fig. 12a**) estaria format per VDAC i ANT en els llocs de contacte, amb l’ajuda d’algunes proteïnes auxiliars com són ciclofilina D a la matriu mitocondrial; i hexoquinasa i PBR (peripheral benzodiazepine receptor) interaccionant amb VDAC (Crompton, 1999). No obstant això, estudis recents han demostrat que ANT no és essencial per la formació del porus de transició, ja que aquest es pot formar de forma dependent de Ca^{2+} en absència de ANT (Kokoszka et al., 2004), i també es pot formar el PTM en absència de VDACs (Baines et al., 2007), però en canvi la presència de ciclofilina D és essencial per a la seva formació (Baines et al., 2005; Tsujimoto et al., 2006). Per tant, sembla ser que només ciclofilina D forma part de la maquinària molecular del PTM, com a component o modulador, mentre que VDAC i ANT podrien participar en el procés només sota determinats estímuls o en determinats tipus cel·lulars. Una possible hipòtesi és que Ciclofilina D actuï com a organitzador central del porus, reclutant proteïnes mitocondrials de forma inespecífica (Galluzzi and Kroemer, 2007).

c) Relació entre ambdós mecanismes de permeabilitat mitocondrial

La relació entre el mecanisme de permeabilitat de transició (PT) i la família de Bcl2 és antiga, ja que des del principi hi ha hagut evidències que el PTM podria estar regulat per Bcl2, ja que cèl·lules sobreexpressores de Bcl2 estan protegides de la inducció del PTM sota alguns estímuls que indueixen PT (Zamzami et al., 1996). La sobreexpressió de Bcl2 també inhibeix l’alliberament d’AIF de l’espai intermembranal de forma dependent del PTM (Susin et al., 1996). No obstant, els membres antiapoptòtics de la família de Bcl2 actuen sobre la MME, tal com hem explicat, i donat que el PTM es forma a la MMI, l’efecte de Bcl2 sobre el PTM podria ser un efecte indirecte o un mecanisme directe encara desconegut.

No hi ha conclusions clares sobre la relació d'ambdós mecanismes de PMME, però és probable que aquests processos estiguin coordinats i integrats, més que no pas siguin processos controlats de forma independent (Forte and Bernardi, 2006).

1.1.3.3 Formació de l'apoptosoma

Apaf-1, el component central de l'apoptosoma, va ser originalment identificat com un homòleg de CED4 de *C. elegans*, que participava en l'activació de caspasa 3 dependent de citocrom c (Zou et al., 1997). Apaf-1 té tres dominis diferents, un domini CARD N-terminal, un gran domini d'unió a nucleòtid i 12-13 repeticions de WD40 a la meitat C-terminal. CARD és responsable de la interacció amb el prodomini de caspasa 9; aquesta interacció és essencial pel reclutament i activació de procaspasa 9 (Li et al., 1997; Qin et al., 1999). Els ratolins *knock out* per Apaf-1 són letals en estadi embrional, i presenten hiperplàsia del cervell, malformacions craniofacials i la no eliminació de les membranes interdigitals, fenotip que correlaciona amb manca d'apoptosi (Cecconi et al., 1998; Yoshida et al., 1998).

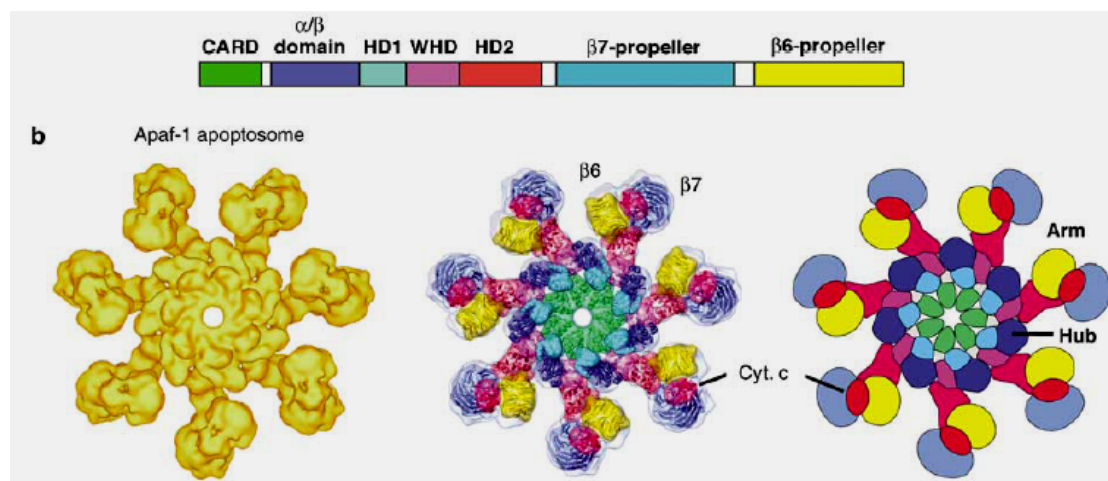


Figura 13. Estructura de l'apoptosoma d'Apaf-1. El panell esquerre mostra una visió per sobre de l'estructura de l'apoptosoma. El panell central mostra l'organització dels dominis de l'apoptosoma que s'ha proposat amb superfícies semitransparents. El panell dret mostra el dibuix del model de l'apoptosoma. El codi de colors que representen els diferents dominis d'Apaf-1 està representant a la part superior. HD1, helical domain I. WHD, winged-helix domain. HD2, helical domain II. Origen: (Yu et al., 2005; Bao and Shi, 2007)

Introducció

La formació de l'apoptosoma involucra Apaf-1, procaspasa 9, citocrom c i ATP (**Fig. 13**). En estat quiescent Apaf-1 és una molècula compacte amb el domini CARD enfonsat entre dues capes α/β , formades per repeticions de WD40. El nucleòtid unit és ADP, que està molt enfonsat en l'estructura i funciona com centre organitzador per mantenir les interaccions entre els dominis i mantenir la conformació compacte (Riedl et al., 2005). Quan citocrom c, que convenientment té la mateixa talla que el domini CARD, es troba al citosol desplaça CARD del seu lloc permetent que l'estructura compacte s'allargui, donant una molècula més linear que polimeritza quan s'uneix a ATP (Acehan et al., 2002). Aquests estudis de criomicroscopia electrònica mostren que l'apoptosoma és una roda de set radis, amb un nucli central que conté el domini de reclutament de procaspasa 9, que està unit al domini CARD de Apaf-1. Lamentablement la conformació de caspasa 9 no és visible en les imatges, però altres tècniques han suggerit una transició de monòmer a dímer anàloga a l'activació de caspasa 8.

1.1.4 Famíia de IAP o proteïnes inhibidores d'apoptosi

En principi hi ha dos vies d'aturar l'activitat d'una caspasa: primer per eliminació a través de la maquinària de degradació del proteasoma, per senyalització de ubiquitina; o, segon, directament inhibint la seva activitat enzimàtica. Les proteïnes de la família de IAP (inhibitor-of-apoptosis proteins), una família de gens que codifica per potents inhibidors de caspases, curiosament presenten evidències de ser capaços de fer ambdues funcions (Salvesen and Duckett, 2002; Riedl and Shi, 2004; Vaux and Silke, 2005). El mecanisme més ben conservat evolutivament sembla ser l'eliminació de caspases. El marcatge per ubiquitina del IAP de *Drosophila melanogaster* (DIAP1) és essencial per a la inhibició d'apoptosi *in vivo*, mentre que *in vitro* DIAP1 només inhibeix dèbilment l'activitat caspasa (Hawkins et al., 1999; Goyal et al., 2000; Lisi et al., 2000; Yan et al., 2004). Per contra, la molècula XIAP (X-link IAP) dels mamífers, la proteïna de la família de IAP més ben estudiada, ha desenvolupat una potent inhibició de l'activitat enzimàtica de les caspases, tant en la fase iniciadora de l'apoptosi (caspasa 9) com en la fase executora (caspases 3 i 7) (Deveraux et al., 1997).

El mecanisme de inhibició de caspasa 9 (**Fig. 14**) es dona a través de la dimerització dels monòmers de caspasa 9 amb el domini BIR3 de XIAP, que permet a XIAP segrestar els monòmers de caspasa 9. Aquesta dimerització inhibidora es dona a través del domini que permet la dimerització, i per tant l'activació, de caspasa 9 (Shiozaki et al., 2003). En canvi, la inhibició de les caspases efectores 3 i 7 es dona per inhibició del centre actiu per part d'una seqüència peptídica contigua al domini BIR2 de XIAP (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001).

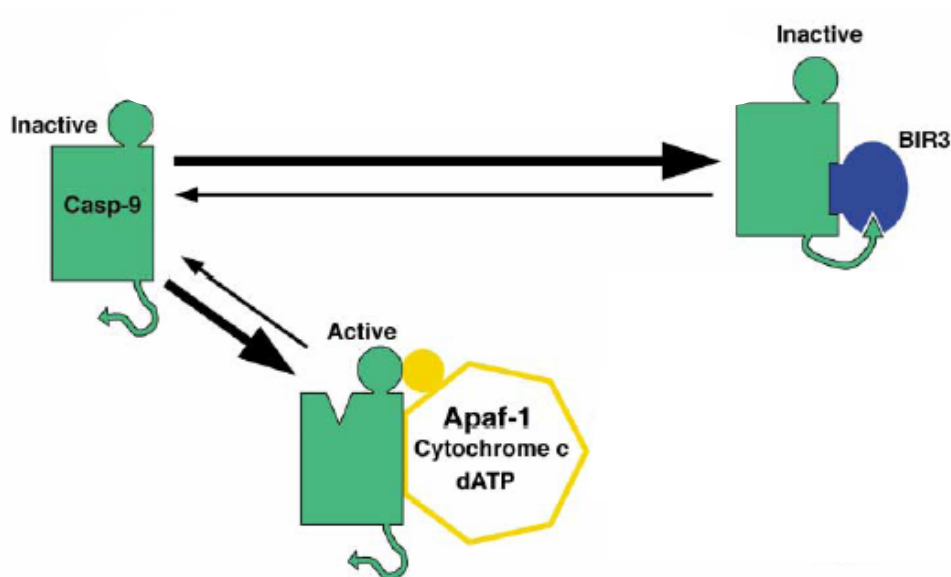


Figura 14. Diagrama esquemàtic de la inhibició i activació de caspasa 9 per XIAP. Caspasa 9 està representada en color verd, amb el domini CARD representat com a un cercle. Les fletxes més gruixudes indiquen la preferència de l'equilibri. En estat basal trobem principalment els monòmers de procaspasa 9 inhibits per dimerització amb el domini BIR3 de XIAP (color blau). Els monòmers de procaspasa 9 lliures, poden ser reclutats i activats en el complex multiproteic de l'apoptosoma (comprès per Apaf-1, citocrom c, ATP i procaspasa 9). Adaptat de (Shiozaki et al., 2003).

Les vies de l'apoptosi contenen molts mecanismes d'amplificació, com ara que les mateixes procaspases sigui substrats de les caspases. Les molècules IAP actuen com a protectors de la cèl·lula en front una activació accidental de caspases, que podria desencadenar la mort apoptòtica. La identificació d'un inhibidor de IAPs en mamífers recolza aquesta idea, al que s'ha anomenat Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) (Du et al., 2000) o DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) (Verhagen et al., 2000). Smac/DIABLO s'uneix als membres de

Introducció

la família IAP i neutralitza la seva activitat antiapoptòtica. A més a més, Smac/DIABLO és una proteïna mitocondrial en condicions normals, que és alliberada al citosol en cèl·lules induïdes a morir, presumiblement seguint la mateixa via de sortida que citocrom c (**Fig. 16**). Estudis estructurals indiquen que un dímer de Smac/DIABLO pot unir-se a molècules de IAP pel domini BIR2 (baculovirus IAP repeat) (Chai et al., 2000; Liu et al., 2000) o pel domini BIR3 (Wu et al., 2000a), alliberant molècules de caspasa i permetent la seva activació.

1.1.5 Funcions no apoptòtiques dels efectors i reguladors de les vies de mort dependents de caspases

a) Caspases

L'observació d'activitat caspasa i la identificació de substrats de caspasa en absència de mort cel·lular ha suscitat un alt interès en les funcions no apoptòtiques de les caspases. Aquestes funcions es poden donar per accions proteolítiques dels seus dominis catalítics, com per funcions no - proteolítiques dels seus prodominis. L'activitat no apoptòtica de les caspases suggereixen que la seva activació ha de ser independent de la inducció de la cascada apoptòtica, portant al tall específic d'un grup de substrats. Hi ha molts substrats de caspases en condicions no apoptòtiques, com són citoquines, quinases, factors de transcripció i polimerases. Les funcions no-proteolítiques de les caspases estan implicades en regulació de supervivència cel·lular, proliferació, diferenciació i inflamació (Lamkanfi et al., 2007).

Caspasa 1 va ser la primera caspasa coneguda (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992), que es va identificar per la seva funció en la maduració de proIL-1 β (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989). Forma part del grup de caspases inflamatòries, i els seus principals substrats són proIL-1 β i proIL-18, dues citoquines que tenen un paper crític en la inflamació. IL-18 estimula la producció de interferó- γ , inducció de citoquines proinflamatòries i activació de les cèl·lules *natural killers* (Dinarello and Fantuzzi, 2003). IL-1 β és el principal intermediari del procés de inflamació, iniciant i/o amplificant una gran varietat d'efectes associats a la immunitat innata i a la resposta de l'organisme a invasions microbianes i a dany tissular (Dinarello, 2004).

En les cèl·lules T, l'activitat enzimàtica de procaspasa 8 és necessària per l'activació de NF- κ B en resposta a determinats estímuls del receptor de cèl·lules T (TcR) i implica l'activitat del prodomini gran de les caspases (Su et al., 2005). Les caspases de prodomini curt també estarien implicades en l'activació de NF- κ B, ja que s'ha vist que en macròfags el tall de PARP-1 per les caspases 3 i 7 en condicions no apoptòtiques contribueix a augmentar la transcripció de NF- κ B (Shall and de Murcia, 2000).

Caspasa 8 també té un paper essencial en la proliferació de les cèl·lules immunitàries. Els pacients amb mutacions inactivants de caspasa 8 presenten danys en la proliferació de cèl·lules T, B i *natural killers*, que els ocasiona freqüents infeccions microbianes ja que no poden activar aquestes cèl·lules (Chun et al., 2002). El requeriment d'activitat caspasa 8 en la via de NF- κ B activada per TcR confirma la funció de caspasa 8 en la via de producció de IL-2 i en la proliferació dels limfòcits T humans (Su et al., 2005).

Les caspases efectores, concretament caspasa 3, també presenten funcions no apoptòtiques. La seva localització subcel·lular i la proteòlisi de substrats associats al control de l'aturada del cicle cel·lular suggereixen que caspasa 3 modula el creixement cel·lular. Per exemple, s'ha trobat caspasa 3 activa en nuclis en divisió de regions proliferatives del cervell anterior de rata (Yan et al., 2001). En cèl·lules limfoides proliferants el tall proteolític dependent de caspases de p27^{KIP1}, inhibidor de CDK, contribueix a la inducció de la progressió en el cicle cel·lular (Frost et al., 2001).

Les caspases també estan involucrades en la diferenciació terminal de varis tipus cel·lulars que requereixen anucleació, com són la diferenciació dels eritròcits (Zermati et al., 2001) i de les cèl·lules que formen la lent ocular (Zandy et al., 2005), la formació de les plaquetes (De Botton et al., 2002) i diferenciació terminal dels queratinòcits (Lippens et al., 2000).

b) Molècules de la via dels receptors de mort

Els receptors de mort, a banda del seu paper en desencadenar l'apoptosi, també participen en vies de senyalització de creixement. Entre aquestes vies hi trobem el creixement hipertròfic dels cardiomiòcits durant el seu desenvolupament,

Introducció

que és promogut per sistema de receptor i lligand: Fas/FasL (o CD95/CD95L). L'estimulació de cardiomiòcits aïllats amb FasL promou l'activació de factors de transcripció, però no la mort cel·lular; en un model *in vivo* de rata es detecta sobreexpressió de Fas i presència de FasL durant la hipertròfia, però no augmenta l'apoptosi de les cèl·lules cardíques (Wollert et al., 2000). Ratolins sense receptor Fas funcional presenten dilatació i fallada del ventricle esquerre, que no és compensada per hipertròfia, com seria si la funció de Fas només estigués lligada als mecanismes de MCP (Badorff et al., 2002).

L'expressió de Fas en cultius primaris de neurones de gangli raquidi, no només no indueix mort cel·lular, sinó que indueix l'activació de la via ERK (extracellular-signal regulated kinase), que comporta la sobreexpressió de p35, proteïna que promou el creixement de neurites. La via de Fas per promoure creixement neurític és independent del factor tròfic NGF (nerve growth factor), i està implicada en la regeneració d'axons en neurones primàries i en la recuperació de la funció nerviosa *in vivo* després del pinçament del nervi ciàtic en ratolins (Desbarats et al., 2003). En estudis recents en neurones corticals i hipocampals embrionals *in vivo* i *in vitro*, s'ha corroborat que FasL no indueix mort cel·lular i que incrementa la formació de neurites. A més a més, han demostrat que la formació de neurites és independent de caspases, però que depèn dels dominis de mort, DD, del receptor (Zuliani et al., 2006). Aquestes dades han revelat una funció nova, i completament diferent dels processos de mort, del sistema Fas/FasL en el desenvolupament del cervell.

Altres molècules implicades en la via dels receptors de mort, com són FADD, una proteïna adaptadora de la via, o FLIP, un homòleg de caspasa 8 que pot potenciar o inhibir l'activació d'aquesta caspasa, també participen en el desenvolupament cardíac. Els ratolins *knock out* per FADD (Yeh et al., 1998) i per FLIP (Yeh et al., 2000) presenten fenotip cardíac, i són letals en estadis embrionals. Aquests ratolins tenen el cor subdesenvolupat, amb la musculatura de la paret ventricular més prima, indicant que ambdues proteïnes participen en el desenvolupament embrional del cor.

c) Membres de la família de Bcl2

Alguns membres individuals de la família de Bcl2 lliguen la regulació de la mort cel·lular programada i el control del cycle cel·lular. Està generalment acceptat que les cèl·lules en cycle són més susceptibles a la mort apoptòtica, mentre que les cèl·lules en estat quiescent són relativament més resistents a la mort. Sovint cèl·lules que estan morint per apoptosi activen també esdeveniments del cycle cel·lular (Meikrantz et al., 1994; Pandey and Wang, 1995).

El primer cop que es va observar relació entre la funció antiapoptòtica de Bcl2 i efectes en la proliferació va ser en cèl·lules dependents de IL-3 deprivades de factor tròfic, que en sobreexpressar Bcl2 esdevenien més petites en presència de IL-3 i que gairebé totes estaven aturades en fase G0 (Vaux et al., 1988). La rellevància fisiològica dels efectes de Bcl2 en la inhibició del cycle cel·lular s'ha estudiat en cultius convencionals i en cultius continus quimioestàtics, que han revelat que Bcl2 no afecta significativament les cèl·lules en cycle en condicions òptimes, però que en condicions subòptimes prolonga la fase G1 (Linette et al., 1996; O'Reilly et al., 1997; Simpson et al., 1999).

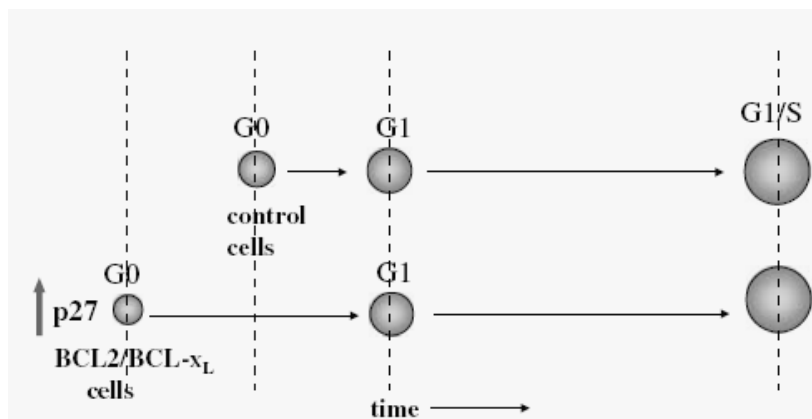


Figura 15. Bcl2 i BclX_L condueixen a la cèl·lula a una parada en fase G0 que retarda la progressió de la fase G1, i la transició de fase G1 a S (Zinkel et al., 2006).

L'expressió de Bcl2 i BclX_L promou l'aturada en fase G0, això provoca un retard en l'entrada de la cèl·lula en fase S (**Fig. 15**) (Janumyan et al., 2003). Bcl2 i BclX_L poden ser modificats post-transcripcionalment per fosforil·lació en múltiples punts de la seva seqüència. Diversos experiments han suggerit que la fosforil·lació pot estar lligada a la progressió del cycle cel·lular (May et al., 1994; Furukawa et al., 2000; Deng et al., 2003), però el significat funcional d'aquesta fosforil·lació encara

Introducció

no està clar, i podria ser dependent del context (Bonney-Berard et al., 2004). La funció antiproliferativa de Bcl2 i BclX_L es dona a través de la sobreexpressió de p27, que podria estar regulat a nivell post-transcripcional, encara que el mecanisme concret es desconeix (Cheng et al., 2004).

Les cèl·lules T transgèniques per Bax, al contrari que les transgèniques per Bcl2, entren en fase S més ràpid que les cèl·lules no transfectades (Brady et al., 1996; Knudson et al., 2001). A més, són més grans i presenten un augment de la degradació de p27, just al contrari que a les cèl·lules T transgèniques per Bcl2 (Cheng et al., 2004). Les cèl·lules Bax^{-/-} no presenten alteració del cycle cel·lular, però els limfòcits DKO per Bax i Bak són més petits i mostren que l'absència de Bax i Bak pot promoure l'entrada en fase G0 (Rathmell et al., 2002). La sobreexpressió de la molècula BH3-only proapoptòtica Bad fa que la cèl·lula no pugui mantenir-se en fase G0, ja que té cdk2 activada permanentment (Chattopadhyay et al., 2001; Janumyan et al., 2003). Aquest efecte depèn completament de la unió de Bad a Bcl2 i BclX_L.

Bax i Bak, a part de la seva funció en la mort apoptòtica, i en la inducció del cycle cel·lular, també regulen la dinàmica del mitocondri, a través del control de la maquinària de morfogènesi del mitocondri (Karbowski et al., 2006). Bax indueix la fusió mitocondrial activant l'acoblament de la GTPasa mitofusina 2 (Mfn2), proteïna que controla la fusió mitocondrial; canviant la seva localització submitocondrial unint-se als llocs d'escissió mitocondrial; i canviant les propietats de mobilitat de la membrana, que correlacionen amb els diferents estats d'unió de GTP a Mfn2 (Karbowski et al., 2006). La sobreexpressió de Mfn2 inhibeix la mort apoptòtica (Sugioka et al., 2004; Neuspiel et al., 2005), Mfn2 col·localitza amb Bax i Bak en el mitocondri durant l'apoptosi (Karbowski et al., 2004; Neuspiel et al., 2005) i la fragmentació mitocondrial del mitocondri es dona al mateix temps que la translocació de Bax al mitocondri i que la sortida de citocrom c de la MME (Karbowski et al., 2004), suggerint que la remodelació de l'estructura mitocondrial participa en la transducció de l'apoptosi. El canvi conformacional de Bax i Bak durant l'apoptosi podria reflectir l'aturada de la seva activitat en d'elongació mitocondrial, permetent un desequilibri en la fissió mitocondrial, o podria inhibir l'activitat Mfn2 al mitocondri.

El paper de la proteïna proapoptòtica Bid (Wang et al., 1996) en el desenvolupament i en l'homeostasi cel·lular s'ha estudiat en ratolins *bid*^{-/-}, que són viables i que no presenten mort cel·lular alterada durant el desenvolupament (Yin et al., 1999). Amb l'edat, aquests ratolins presenten un desordre cel·lular mieloide similar a la leucèmia mielomonocítica crònica (Zinkel et al., 2003), indicant que Bid participa en el manteniment de l'homeostasi mieloide. Estudis recents han demostrat que l'activitat apoptòtica de Bid pot estar regulada negativament per fosforil·lació (Desagher et al., 2001; Kamer et al., 2005; Zinkel et al., 2005). Bid fosforil·lat *in vitro* és resistent al tall per caspases. Per tant la fosforil·lació de Bid podria inhibir l'activació de la funció proapoptòtica de Bid (Desagher et al., 2001; Kamer et al., 2005). Les cèl·lules hematopoètiques normals indueixen apoptosi en resposta al dany a l'ADN, en canvi en absència de Bid, les cèl·lules mieloides acumulen mutacions, resisteixen a la MCP i presenten característiques de proliferació incontrolada (Zinkel et al., 2005). Quan una cèl·lula pateix danys en la replicació es localitza Bid al nucli (Zinkel et al., 2005). Aquests resultats suggereixen que Bid participa en la reparació de l'ADN, en la resposta cel·lular als punts crítics del cicle cel·lular i en la integració entre la inducció d'apoptosi i la reparació de l'ADN.

La proteïna proapoptòtica Bim regula l'apoptosi en la maduració de la glàndula mamària, concretament participa en l'eliminació de les cèl·lules que omplen l'espai luminal dels conductes mamaris. L'eliminació de Bim en el ratolí *Bim*^{-/-} fa que aquestes cèl·lules siguin eliminades per mecanismes independents de caspases, però *in vivo* Bim és un regulador crític de la mort dependent de caspases en la formació de la glàndula mamària (Mailleux et al., 2007). La isoforma de Bim, BimEL, es troba molt expressada en la retina durant el seu desenvolupament postnatal, però posteriorment disminueix dràsticament (Donovan et al., 2006). Recentment s'ha demostrat que Bim participa la via de mort cel·lular tant en el desenvolupament normal de la retina com en casos de degeneració de la retina, durant la qual es reexpressen isoformes de Bim, i que si l'expressió de Bim està impedita, en cèl·lules *Bim*^{-/-}, la mort succeeix de forma independent de caspases (Doonan et al., 2007).

1.2 VIES DE MORT INDEPENDENTS DE CASPASES

1.2.1 AIF o Apoptotic Inducing Factor

AIF és una flavoproteïna de la membrana mitocondrial interna que s'ha demostrat que en ser translocada al nucli és un important executor de mort cel·lular independent de caspases en diferents tipus cel·lulars (Otera et al., 2005; Polster et al., 2005; Yuste et al., 2005b).

AIF recombinant indueix condensació de la cromatina i degradació de l'ADN d'alt pes molecular en nuclis aïllats, que és un dels trets bioquímics que caracteritzen la mort cel·lular programada (MCP), i també indueix l'inflament mitocondrial i l'alliberament de citocrom c en mitocondris aïllats (Susin et al., 1999). A més, aquesta degradació d'ADN d'alt pes molecular tindria lloc de forma independent de l'acció de caspases, segurament per interacció d'AIF amb alguna nucleasa, ja que AIF no té activitat nucleasa endògena (Susin et al., 2000). No obstant, estudis recents han demostrat que AIF només és responsable de la morfologia nuclear en estadis inicials de condensació perifèrica de la cromatina durant la MCP, però que en canvi no és responsable de la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular (Yuste et al., 2005b). Els ratolins KO per AIF (*aif* $-/-$) no poden dur a terme el procés de morfogènesi correctament degut a la falta de MCP durant la cavitació embrional i moren en estadi embrional (Joza et al., 2001).

AIF *in vivo* es sintetitza com a un precursor de 67kDa que, al ser importat al mitocondri, és processat a la forma madura mitocondrial de 62kDa que es troba ancorada a la membrana mitocondrial interna (Susin et al., 1999; Otera et al., 2005). L'arribada d'un estímul de mort al mitocondri indueix la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME), però només hi ha alliberament d'AIF al citosol si prèviament es talla AIF donant una forma d'AIF de 57kDa, que és soluble i pot sortir al citosol (Otera et al., 2005). Estudis en mitocondris aïllats de fetge i cervell (Polster et al., 2005), i en neurones en isquèmia (Cao et al., 2007), han proposat que l'alliberament d'AIF del mitocondri depèn de l'acció proteolítica de la proteasa dependent de calci *calpaina I*. D'altres estudis proposen que l'alliberament i tall d'AIF es pot dur a terme de forma dependent o independent de Ca^{2+} , amb la implicació de calpaines (proteases dependent de calci) o de catepsines (proteases independents de calci) (Yuste et al., 2005a).

En el nemàtode *C. elegans* l'homòleg d'AIF (WAH-1) s'allibera del mitocondri sota un estímul apoptòtic de forma dependent de CED-3 (homòleg de les caspases). A més, WAH-1 s'associa i coopera amb l'homòleg de Endonucleasa G (CPS-6) per promoure degradació d'ADN i mort apoptòtica (Wang et al., 2002). Aquest treball contradiu el treball dels autors de la identificació i clonatge d'AIF (Susin et al., 1999), que proposen un paper d'AIF en la MCP independent de l'activació de caspases (Susin et al., 2000). Estudis en la línia cel·lular HeLa han demostrat que en determinades condicions l'alliberament d'AIF i EndoG del mitocondri és un procés dependent de l'activació de caspases (Arnoult et al., 2003). Sorprenentment, altres grups que han treballat en sistemes similars (Yu et al., 2002) han observat que AIF pot translocar des del mitocondri al nucli en absència d'activitat caspasa. Diverses revisions han conclòs que generalment el mecanisme molecular d'AIF en la mort cel·lular actua de forma independent de caspases, amb petites excepcions que requereixen activitat caspasa per a l'alliberament d'AIF (Cregan et al., 2004; Kroemer and Martin, 2005).

Recentment s'ha demostrat que AIF, a part del seu paper com a executor apoptòtic, AIF també regula la fosforil·lació oxidativa, ja que la pèrdua d'AIF redueix de manera dràstica la formació del complex I de la cadena respiratòria i la seva activitat (Vahsen et al., 2004). Aquesta funció podria explicar el fenotip d'atàxia i degeneració de la retina que presenten els ratolins Harlequin (ratolí "*knock in*" per AIF, que presenta una reducció del 80% de l'expressió d'AIF degut a una inserció proviral dins del gen *aif*), aquest fenotip podria ser resultat d'una fosforil·lació oxidativa deficient (Klein et al., 2002). Recentment s'ha demostrat que AIF mitocondrial, en la seva funció reguladora de la fosforil·lació oxidativa, juga un paper antioxidant crític en la protecció dels cardiomiòcits de la mort per estrès oxidatiu durant la isquèmia o la reoxigenació (van Empel et al., 2005). Així doncs AIF podria contribuir a la mort apoptòtica independent de caspases per dos mecanismes, afectant a la funció mitocondrial i induint la degradació de la cromatina (**Fig. 16**).

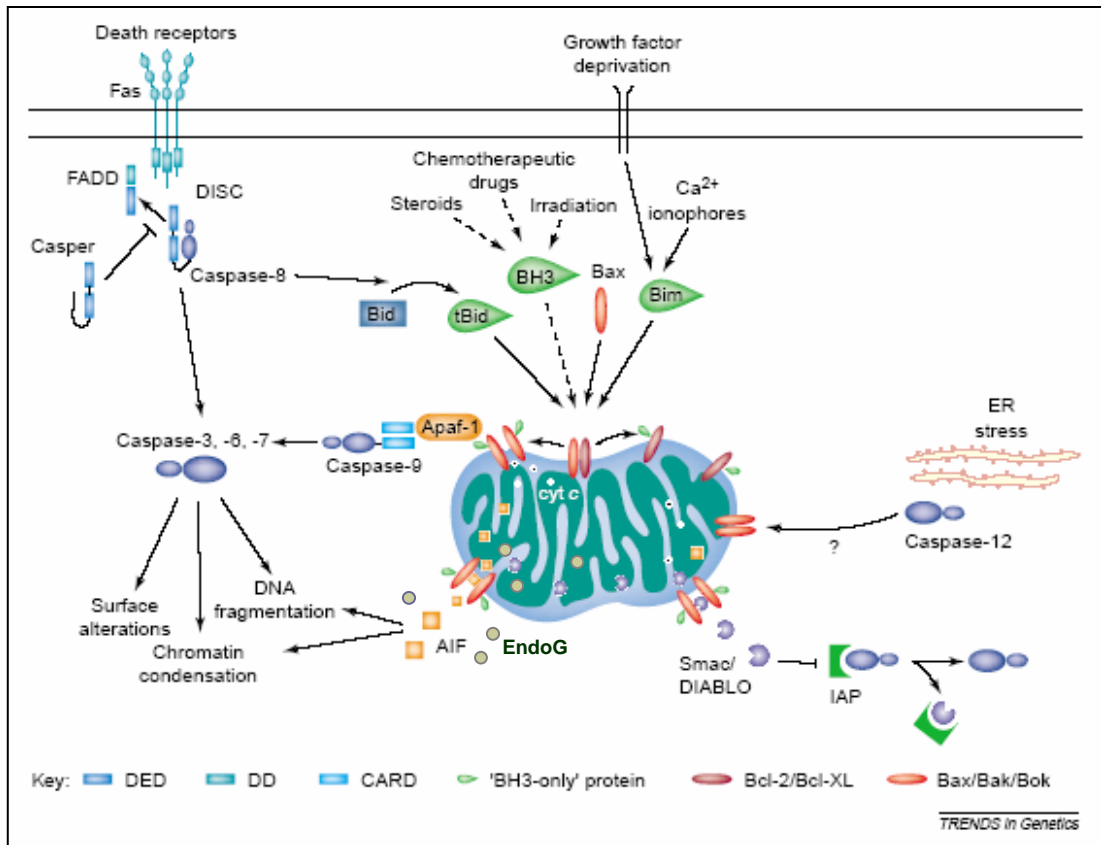


Figura 16. Visió general de les vies de senyalització de mort en mamífers. L'oligomerització dels receptors de mort provoca el reclutament de FADD i caspasa 8 a la regió citosòlica del receptor. L'activació de caspasa 8 activa al seu torn les caspases terminals 3, 6 i 7. Un cop actives, aquestes tallen selectivament dianes intracel·lulars que en últim terme portaran a les manifestacions fenotípiques de l'apoptosi. En aquest context, FLIP (també anomenat Casper) antagonitza la senyalització dels receptors de mort interferint amb el reclutament de caspasa 8 al receptor. Molts altres estímuls apoptòtics estimulen la disfunció mitocondrial com a senyal d'apoptosi. Diverses proteïnes BH3-only, com ara Bid i Bim, s'activen en resposta a estímuls específics de mort. La seva activació es pot donar per tall proteolític (en el cas de Bid) o per dissociació de les proteïnes que les segresten (en el cas de Bim). Un cop activades, les proteïnes BH3-only transloquen a la superfície del mitocondri on s'associen a les proteïnes multidomini de la família de Bcl2, inactivant les antiapoptòtiques (Bcl2 i BclX_L) i activant les proapoptòtiques (Bax i Bak); aquestes darreres formen porus per elles mateixes o interaccionen amb porus preexistents a la membrana, promovent l'alliberament de factors del mitocondri. La sortida de citocrom c indueix la formació de l'apoptosoma en associació amb Apaf-1 i caspasa 9. AIF i EndoG indueixen els mecanismes d'apoptosi independents de caspases. Smac/DIABLO inactiva les proteïnes IAP que estan reprimint les caspases. L'estrès de reticle endoplasmàtic activa caspasa 12, que potser podria interaccionar amb la via de mort mitocondrial. Adaptat de (Joza et al., 2002).

1.2.2 Endonucleasa G o EndoG

L'activitat enzimàtica endonucleasa és la capacitat de trencar una cadena d'àcid ribonucleic per un enllaç fosfodiéster intern. *Endonucleasa G* és la principal endonucleasa de l'espai intermembrana mitocondrial i es creu que té funcions en la regulació de la síntesi i reparació de l'ADN mitocondrial (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993; Tiranti et al., 1995). L'homòleg d'EndoG a *Caenorhabditis Elegans*, Cps-6, va ser la primera proteïna mitocondrial de *C. Elegans* que es va poder demostrar que regulava l'apoptosi *in vivo* (Parrish et al., 2001). Com també passa amb AIF, s'ha proposat que un cop EndoG és alliberat des del mitocondri al citosol es transloca al nucli, on actuaria com a un executor apoptòtic de degradació d'ADN independent de les caspases (**Fig. 16**) (Li et al., 2001). Treballs en *C. elegans* han demostrat que, almenys en aquest organisme, els homòlegs de EndoG i AIF interaccionen, de forma dependent de caspases, per a desencadenar la degradació de l'ADN i la mort cel·lular (Wang et al., 2002). L'activitat d'EndoG en la fragmentació nucleosomal de l'ADN durant un estímul apoptòtic s'ha detectat en models cel·lulars on CAD, la principal nucleasa apoptòtica, hi és deficient (Li et al., 2001). La importància de EndoG en l'apoptosi independent de caspases encara no està clara. El primer ratolí EndoG *knock out* generat, que eliminava gran part del gen *endoG*, era letal embrional (Zhang et al., 2003); això contrasta amb el fenotip benèvol detectat en dos nous ratolins EndoG^{-/-}, en els que s'ha bloquejat només l'exó 2 del gen (Irvine et al., 2005; David et al., 2006), i que s'explica perquè en el primer cas, a part del gen *endoG*, també es va eliminar un altre gen que es troba sobreposat a la seqüència d'*endoG*. En ambdós treballs l'anàlisi de l'apoptosi s'ha realitzat exclusivament en models cel·lulars que expressen CAD, la principal nucleasa apoptòtica, que pot emmascarar qualsevol efecte degut a la manca de EndoG, la qual cosa ha suggerit la necessitat de generar el ratolí doble *knock out* CAD^{-/-} i EndoG^{-/-} per poder aclarir el paper de EndoG a l'apoptosi tal com Parrish i Xue han revisat (Parrish and Xue, 2006).

1.2.3 OMI/HtrA2

OMI/HtrA2 és una molècula mitocondrial que té funció de proteasa en serines quan és alliberada al citoplasma. La seva sobreexpressió indueix una mort cel·lular atípica, que no es pot inhibir per l'ús d'un inhibidor general de caspases (zVAD-

Introducció

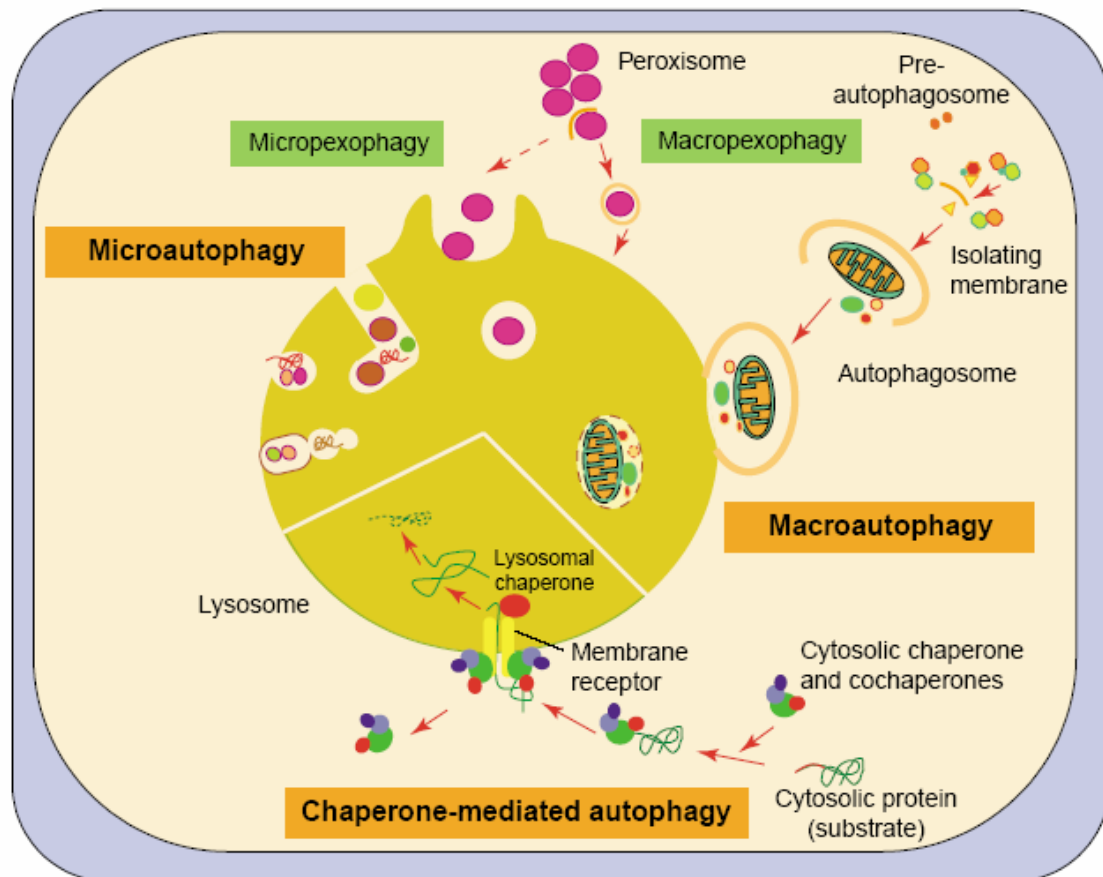
fmk), i en la que no es detecta activitat caspasa (Suzuki et al., 2001). A pesar que OMI/HtrA2 s'uneix al inhibidor de caspases XIAP, permetent l'activació de caspases, si es muta OMI/HtrA2 s'observa neurodegeneració i esgotament muscular, possiblement degut a una sensibilització al estrès mitocondrial (Jones et al., 2003). El ratolí KO OMI/HtrA2 *-/-* presenta una alta susceptibilitat a la mort cel·lular i un desordre neurodegeneratiu letal (Martins et al., 2004). Aquests fets suggereixen que la funció principal de OMI/HtrA2 podria ser el manteniment de la fisiologia mitocondrial i no pas la regulació del procés de mort a través de la interacció amb XIAP.

1.3 AUTOFÀGIA

L'autofàgia és el nom genèric que es dona a qualsevol procés intracel·lular de degradació de components citosòlics dins dels lisosomes. El resultat de l'autofàgia sempre és el mateix: la dissociació completa del substrat en els seus components essencials duta a terme pels enzims lisosomals (Seglen and Bohley, 1992; Cuervo, 2004). La funció més ben entesa de l'autofàgia és el manteniment de l'homeostasi cel·lular ja que, juntament amb altres sistemes proteolítics, els lisosomes participen en el recanvi dels constituents citosòlics, degradant tant proteïnes citosòliques solubles com orgànuls danyats, toxines i patògens intracel·lulars (Kim and Klionsky, 2000; Lemasters et al., 2002; Talloczy et al., 2002). Així doncs l'autofàgia permet a la cèl·lula la renovació de components cel·lulars i a més li dona energia gràcies al reciclatge dels productes finals de la degradació (aminoàcids, àcids grassos i nucleòtids) .

S'han descrit tres tipus principals d'autofàgia en mamífers: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia mitjançada per xaperones (**Fig. 17**). En la macroautofàgia una membrana no lisosomal envolta els elements citosòlics que s'han d'eliminar, creant un autofagosoma, al que posteriorment se li uneixen lisosomes, aportant els enzims necessaris per a la degradació (Fengsrud et al., 2000; Ohsumi, 2001; Cuervo, 2004). En la microautofàgia ocorre un procés semblant, però és la pròpia membrana del lisosoma qui envolta els substrats citosòlics (Muller et al., 2000). En ambdós casos la membrana de la vesícula portadora és ràpidament eliminada, facilitant l'accés de les hidrolases als substrats. En el tercer tipus, l'autofàgia mitjançada per

xaperones, les proteïnes citosòliques solubles són unides selectivament a un receptor de la membrana lisosomal, que permet la seva translocació al interior del lisosoma (Dice, 1999).



TRENDS in Cell Biology

Figura 17. Tipus d'autofàgia en cèl·lules de mamífer. Existeixen tres tipus principals d'autofàgia: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia mitjançant xaperones. Els substrats internalitzats poden ser diferents orgànuls citosòlics (cercles) i/o proteïnes lliures (cabdells). Com a exemple d'autofàgia selectiva d'orgànuls, es mostra com els peroxisomes són alliberats al lisosoma per autofàgia específica de peroxisomes (macropexofàgia). La fletxeta amb la línia trencada indica la degradació de peroxisomes per microautofàgia (micropexofàgia), però que només s'ha descrit en llevats. Nota: l'autofàgia mitjançant xaperones es mostra augmentada per poder distingir les proteïnes de la membrana lisosomal que participen en la internalització dels substrats. Origen: (Cuervo, 2004)

L'autofàgia també té un paper en la mort cel·lular, la que s'anomena mort cel·lular programada (MCP) de tipus II o mort no apoptòtica (Bursch et al., 2000). Es diferencia morfològicament de la MCP apoptòtica, però comparteixen mecanismes

Introducció

comuns. Alguns mecanismes intracel·lulars que activen o bloquegen l'apoptosi també tenen efectes similars sobre l'autofàgia (Xue et al., 1999; Lemasters et al., 2002).

Aquests dos papers de l'autofàgia, el protector per eliminació de danys potencials i l'inductor de mort, no són contradictoris sinó que actuen en diferents estadis d'una malaltia o en diferents entorns cel·lulars (Ogier-Denis and Codogno, 2003). L'activació inicial d'autofàgia en resposta a un dany cel·lular probablement protegeix la cèl·lula, segregant i eliminant les macromolècules o orgànuls danyats. Però un cop s'ha assolit un cert nivell de dany intracel·lular l'autofàgia esdevé un mecanisme efectiu d'eliminació de la cèl·lula danyada del teixit.

La deficiència de LAMP-2 (lysosome-associated membrane protein-2), un important constituent de la membrana lisosomal, incrementa la mortalitat en ratolins i els supervivents presenten acumulacions de vacuoles autofàgiques en molts teixits, entre ells el cor. La ultraestructura dels seus cardiomiòcits és anormal i la contractilitat es veu severament reduïda (Tanaka et al., 2000). La deficiència induïda de Atg5 (autophagy-related 5), un altre component de les vies d'autofàgia en el cor, provoca hipertròfia cardíaca i a més el cor presenta l'estructura del sarcòmer desorganitzada (Nakai et al., 2007). Ambdós estudis suggereixen que l'activitat autofàgica és essencial per al bon funcionament del cor en condicions normals.

A més a més l'autofàgia també està involucrada en la mort dels cardiomiòcits durant el dany isquèmic, tal com han demostrat diferents autors utilitzant diferents models: en pacients en l'estadi terminal de fallada cardíaca (Knaapen et al., 2001), en un model d'inducció de mort per isquèmia i reperfussió en la línia cel·lular miocitària HL-1 (Hamacher-Brady et al., 2007), en cardiomiòcits en cultiu utilitzant deprivació de glucosa per mimetitzar la isquèmia (Matsui et al., 2007) i en cors de ratolí *in vivo* en isquèmia i reperfussió (Matsui et al., 2007). En tots els estudis s'han utilitzat diferents marcadors d'autofàgia, suggerint que efectivament l'autofàgia està involucrada en la mort dels cardiomiòcits durant la isquèmia cardíaca. Altres estudis en llevats i mamífers han aportat que la molècula antiapoptòtica Bcl2 podria estar reprimint la via autofàgica per interacció amb Beclin-1, una proteïna autofàgica ben conservada evolutivament (Patingre et al., 2005).

2. COR: FISIOLOGIA I PATOLOGIES

2.1 FISIOLOGIA DEL COR

El cor humà consta de dues bombes: el cor dret, que rep la sang dels òrgans perifèrics i la impulsa cap als pulmons, i el cor esquerre, que rep la sang oxigenada dels pulmons i l'envia cap als òrgans perifèrics (**Fig. 18**). Cada bomba es compon d'una aurícula i un ventricle. Les aurícules funcionen com a bombes encebadores que afavoreixen que els ventricles s'omplin de sang. Els ventricles, al contreure's, transmeten una gran pressió a la sang i la impulsen a través dels pulmons o per la circulació perifèrica. A més a més, el cor posseeix un sistema de conducció especial que manté el seu propi ritme, i transmet els potencials d'acció a tot el múscul cardíac (Guyton and Hall, 2001).

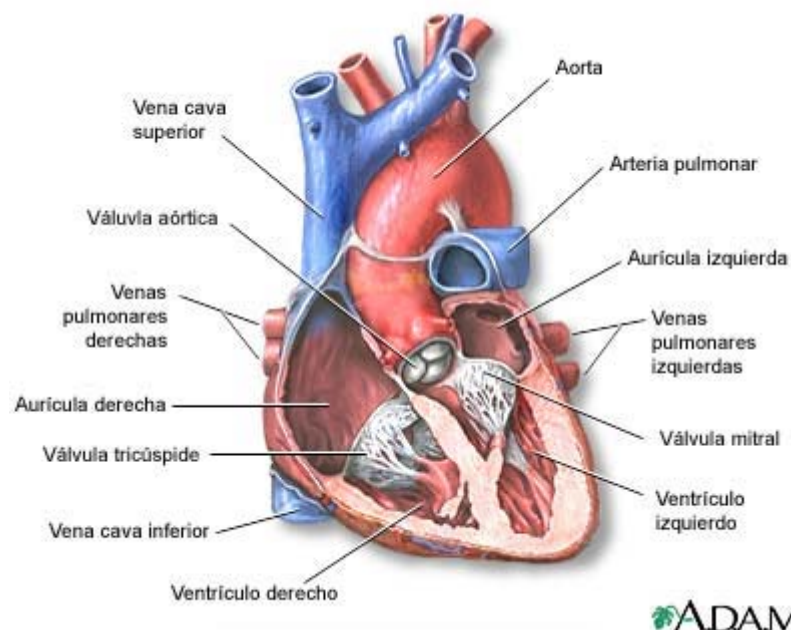


Figura 18. Anatomia del cor. Tall transversal d'un cor en condicions normals. Mostra la part interna del cor que està formada per vàlvules, cavitats i vasos associats (Biblioteca Nacional de Medicina dels Estats Units, 2007).

2.2 FISIOLOGIA DEL CARDIOMIÒCIT

El metabolisme del múscul cardíac és diferent que el del múscul esquelètic en diferents aspectes. En primer lloc, el treball realitzat és molt menys variable que el que es dona al múscul esquelètic. En segon lloc, el cor és un teixit completament

Introducció

aeròbic, mentre que el múscul esquelètic pot funcionar de forma anaeròbica durant períodes limitats. Els mitocondris estan empaquetats de manera molt més densa al cor que en altres cèl·lules, i constitueixen gairebé la meitat del volum d'un cardiomiòcit. En tercer lloc, el ventricle gairebé no conté reserves de energètiques en forma de glucògen o lípids, encara que sí que conté una petita quantitat de creatina fosfat, que funciona com una reserva energètica addicional ja que genera ATP sense necessitat de metabolitzar combustibles. En conseqüència, l'aportació d'oxigen i de combustibles procedents de la sang ha de ser continua per tal de satisfer la demanda energètica il·limitada del cor. Aquest òrgan utilitza diversos combustibles, principalment àcids grassos, però també glucosa, lactat i cossos cetònics (Mathews and Holde, 1998).

2.2.1 Estructura subcel·lular del cardiomiòcit

Els cardiomiòcits són els components essencials de la musculatura estriada cardíaca, on les fibres contràctils o miofibril·les, que ocupen el 50% del volum cel·lular, han de compartir lloc amb tots els orgànuls cel·lulars. Són cèl·lules allargades, majoritàriament binucleades, amb els nuclis col·locats en posició central i molt riques en mitocondris (35% del volum cel·lular). El material contràctil cardíac, està format per filaments gruixuts de miosina, que formen les bandes A, i per filaments prims d'actina, que formen les bandes I. Els cardiomiòcits adjacents estan units per discs intercalars (**Fig. 19**), que tenen tant funció d'ancoratge del citoesquelet com d'unió elèctrica dels cardiomiòcits adjacents. La unió de les fibres del citoesquelet a la membrana fa que la força de contracció es transmeti de forma eficient. El reticle sarcoplasmàtic (que comprèn del 0,6 al 1,5% del total de volum cel·lular) es troba embolicat al voltant de les fibres contràctils de forma direccional i ordenada, i participa en l'equilibri de calci durant la contracció cel·lular (Sommer and Waugh, 1978; Clark et al., 2002).

La contracció muscular, que es dona quan els filaments prims llisquen sobre els gruixuts, entrecreuant-se, és estimulada per la unió de calci a les miofibril·les. Els filaments prims, a més d'actina, contenen quatre proteïnes més, tropomiosina i troponines I, C i T. La unió de calci a la troponina C produeix un reordenament del complex troponina-tropomiosina-actina que permet que es formin els ponts creuats

entre ambdós filaments, i per tant la contracció. La membrana plasmàtica (o sarcolema) forma invaginacions cap a l'interior de la cèl·lula, anomenats túbuls T, que posen en contacte el sarcolema amb el reticle sarcoplasmàtic. El reticle sarcoplasmàtic (o endoplasmàtic), que envolta les miofibril·les, pot tenir una concentració de calci fins 10.000 vegades superior a la concentració que hi ha a les miofibril·les. Els impulsos nerviosos motors despolaritzen la membrana plasmàtica, i en conseqüència la membrana del reticle, provocant l'obertura dels canals de Ca^{2+} , un cop el Ca^{2+} entra en contacte amb les miofibril·les estimula la contracció. Un cop passat l'impuls nerviós, el Ca^{2+} és captat ràpidament cap al reticle endoplasmàtic i les fibres es relaxen, preparant la cèl·lula per a una nova contracció (Mathews and Holde, 1998).

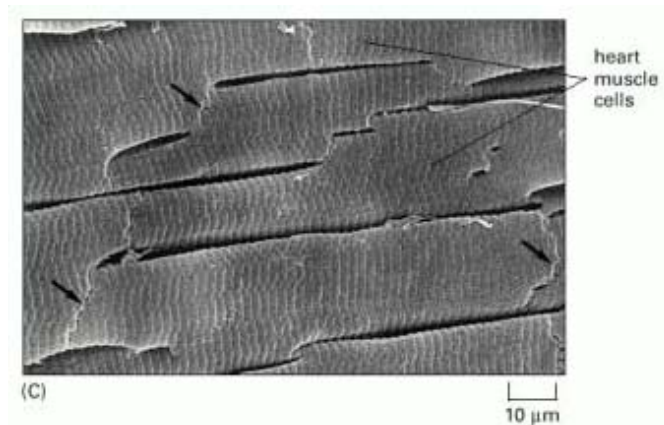


Figura 19. Imatge microscòpia electrònica del múscul cardíac. Les fletxes senyalen les unions intercalars. Origen: (Alberts, 2002).

2.2.2 Proliferació, diferenciació i hipertròfia en el període postnatal

La proliferació i la diferenciació són dos aspectes diferents del creixement cel·lular. A diferència del que passa amb el múscul esquelètic, els cardiomiòcits embrionals de rata són capaços de dividir-se quan ja expressen gens de diferenciació estructurals específics del seu teixit. Durant el desenvolupament embrional els cardiomiòcits estan proliferant i no és just fins després del naixement que perden la seva habilitat per dividir-se. Durant els tres primers dies de vida postnatal els cardiomiòcits continuen proliferant, són gairebé tots mononucleats i mantenen un volum cel·lular constant. En canvi, a partir del quart dia el nombre de cèl·lules es

Introducció

manté constant i comencen a augmentar el volum cel·lular i el percentatge de binucleació. El volum cel·lular seguirà augmentant fins la vida adulta, però el procés de binucleació acaba el dia 12, quan el cor ja presenta el mateix percentatge de cardiomiòcits binucleats que té en la vida adulta (Li et al., 1996). Així doncs, el canvi entre proliferació dels cardiomiòcits (o hiperplàsia del cor) a hipertròfia dels cardiomiòcits és ràpid i irreversible i té lloc just després del naixement. Durant aquest període on els cardiomiòcits deixen de proliferar i comencen a hipertrofiar-se (fins a 14 dies després del naixement) s'ha descrit també que els cardiomiòcits perden l'expressió de les ciclins A, B i D i de les quinases dependents de ciclina CDK2, CDK4 i cdc2; tot i que l'activitat de cdc2 descendeix més lentament i es manté en 50% d'activitat durant aquest període (Kang and Koh, 1997). Com que cdc2 és responsable del pas de fase G2 a mitosi i l'activitat residual cdc2 coincideix amb el període de binucleació, això ha suggerit a diversos autor que la binucleació dels cardiomiòcits es dona per divisió nuclear o carioquinesi però sense que hi hagi divisió cel·lular, a diferència del que passa a les fibres de múscul esquelètic, que són multinuclears degut a la fusió de diferents cèl·lules musculars.

Per tant els cardiomiòcits són cèl·lules postmitòtiques i que no tenen capacitat proliferativa en el cor adult, per la qual cosa és molt important la seva protecció contra la mort cel·lular, ja que no poden ser reemplaçats.

2.2.3 Apoptosi i desenvolupament cardíac

L'apoptosi és essencial per a la regulació precisa de l'homeostasi cel·lular i del desenvolupament. En aquest apartat discutirem alguns exemples de participació de l'apoptosi en el desenvolupament i formació del cor.

La reacció de TUNEL (Gavrieli et al., 1992) permet la detecció de talls en l'ADN *in situ*, ja que marca les cèl·lules on té lloc fragmentació de l'ADN nuclear per incorporació de nucleòtids TdT marcats fluorescentment als extrems 3'-OH de les cadenes d'ADN obertes, que sovint deriva de l'acció de les caspases. Aquesta tècnica ha permès detectar fragmentació d'ADN durant el desenvolupament embrional de pollastre en diversos teixits, entre ells el cor (Wride et al., 1994), i en cors embrionals de rata, associat a morfologia apoptòtica (Takeda et al., 1996).

Aquests fets indiquen la participació de la mort cel·lular programada en el desenvolupament cardíac.

Durant els estadis finals del desenvolupament embrional del cor, una simple estructura tubular connectada a un únic ventricle primitiu esdevé, gràcies a un complex procés morfogenètic, la part del cor que alinea els ventricles dret i esquerre amb les artèries pulmonars i aorta. La correcta connexió dels ventricles a les seves respectives artèries es dona per l'eliminació dels cardiomiòcits per un procés de mort cel·lular programada restringit en el temps i l'espai, ja que si s'impedeix l'apoptosi durant aquest procés per l'ús de l'inhibidor general de caspases zVAD-fmk, es poden trobar forats entre les cavitats cardíques o fins i tot els dos grans vasos connectats al ventricle dret (Watanabe et al., 1998; Watanabe et al., 2001; Schaefer et al., 2004). El conjunt d'aquest resultats suggereixen que la mort cel·lular programada dependent de caspases és necessària durant el desenvolupament del cor per a la correcta formació de les cavitats cardíques i la correcta unió de les artèries als seus respectius ventricles, encara que els mecanismes precisos es desconeixen.

La importància de les molècules de la via extrínseca durant el desenvolupament del miocardi s'ha pogut observar en els fenotips de ratolins *knock out* d'alguns components de la via. Els ratolins caspasa 8 *-/-* presenten desenvolupament anormal i reduït del múscul cardíac i moren en l'estadi embrional. El nombre de cèl·lules hematopoietiques precursors en aquests ratolins també es troba dràsticament disminuït (Varfolomeev et al., 1998). Malgrat això, un altre article suggereix que els problemes en la formació de la placenta són els que causen el fenotip, ja que el desenvolupament *ex vivo* de embrions caspasa 8 *-/-* és viable i no presenten fenotip cardíac (Sakamaki et al., 2002).

Els ratolins *knock out* per FADD moren en estadi embrional i presenten fallada cardíaca degut a que tenen el cor hipoplàsic i hemorràgies abdominals (Yeh et al., 1998). En el mateix treball es presenta un ratolí quimera, que només presenta el genotip FADD *-/-* al cor, i que presenta el mateix fenotip cardíac observat en el ratolí KO per FADD, descartant així els problemes placentaris que presenta el ratolí KO per caspasa 8. Els embrions FLIP *-/-* no sobreviuen més enllà de dia 10,5 en l'embriogènesi (Yeh et al., 2000) i, al igual que el KO de FADD, presenten un desenvolupament cardíac anormal, que es manifesta amb una paret ventricular més

Introducció

prima i mal irrigada. El paper d'aquestes molècules en el desenvolupament es separa de merament la regulació de mort, ja que presenten una disminució en el nombre de cèl·lules al cor, suggerint que la via dels receptors de mort podria estar regulant la diferenciació dels cardiomiòcits.

Els ratolins doble *knock out* per les caspases efectores 3 i 7 moren immediatament després del naixement i també presenten defectes en el desenvolupament cardíac. En concret els cors d'aquests ratolins DKO presenten dilatació de les cavitats, i desorganització i no-compactació de la musculatura ventricular. El fenomen de no-compactació és similar a l'observat en els ratolins KO per FADD, Flip i caspasa 8, tot i que aquests ratolins presenten anormalitats en el desenvolupament addicionals, i moren durant la gestació. Els fibroblasts DKO per caspasa 3 i 7 són resistents a la mort induïda per via mitocondrial i per receptors de mort i preserven el potencial de membrana mitocondrial. En aquests fibroblasts no s'observa translocació d'AIF al nucli, indicant que almenys en aquest tipus cel·lular la translocació d'AIF al nucli i la conseqüent degradació de la cromatina depèn de les caspases 3 i 7. A més a més, la translocació de Bax al mitocondri i la sortida de citocrom c es troben retardades, indicant que les caspases 3 i 7 són elements claus pels esdeveniments mitocondrials de mort (Lakhani et al., 2006).

2.3 PATOLOGIES CARDÍAQUES

Les malalties cardiovasculars són la primera causa de mort en tot el món. En contra del que molta gent pensa, les malalties cardiovasculars han avançat més enllà dels països desenvolupats, i el 80% de les morts per aquesta patologia es donen en països amb economies mitjanes i baixes (World Heart Federation, 2007). Segons l'informe d'Estadístiques Europees de Malalties Cardiovasculars de l'any 2000 de la Fundació Britànica del Cor, el 38% de les morts a Espanya són causades per alguna patologia cardiovascular, en front del 48,5% a Europa i el 41,2% als Estats Units.

2.3.1 Cardiomiopatia isquèmica i infart de miocardi

La causa més comuna de mort en la cultura occidental és la cardiopatia isquèmica, que és conseqüència d'un flux coronari insuficient que causa aproximadament el 35% de les morts a EE.UU (American Heart Association, 2004).

Algunes morts es donen de forma inesperada com a conseqüència d'una oclusió coronària aguda, mentre que d'altres es produeixen lentament, durant setmanes o anys, degut al debilitament progressiu del procés de bombeig cardíac. La causa més freqüent de la disminució del flux sanguini coronari és l'*aterosclerosi*.

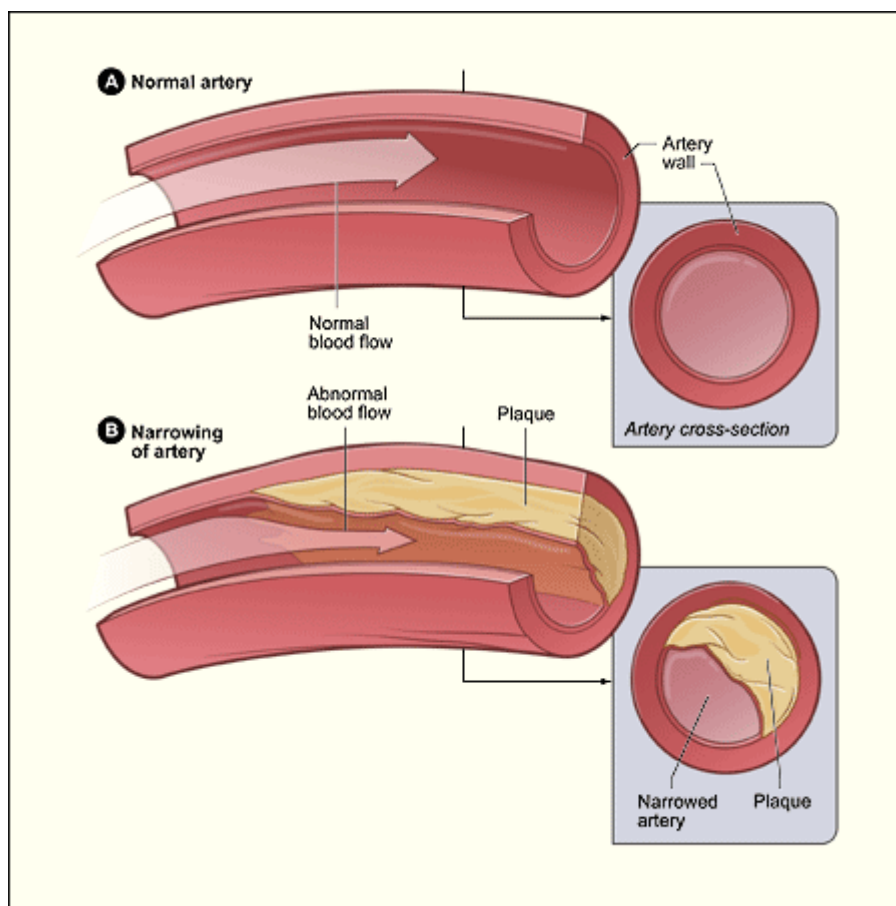


Figura 20. Esquema d'una artèria sana amb flux sanguini normal (a) i de la formació d'una placa d'ateroma que va empetitint la llum de l'artèria (b) (National Lung, Heart and Blood Institute, USA, 2006).

En persones que tenen una predisposició genètica o persones que mengen quantitats excessives de colesterol i altres grasses gradualment se'ls hi dipositen grans quantitats de colesterol sota l'endoteli en molts punts de les artèries de tot el cos. Al cap d'un temps, aquestes zones de dipòsit són envaïdes per teixit fibrós, i sovint també es calcifiquen. El resultat és el desenvolupament de *plaques d'ateroma*, que donen relleu al interior del lumen vascular i bloquegen totalment o parcialment el flux sanguini (**Fig. 20**). Un lloc freqüent a on es desenvolupen plaques d'ateroma

Introducció

són els primers centímetres de les artèries coronàries principals (Guyton and Hall, 2001). Les cèl·lules de la musculatura llisa pròximes a les plaques d'ateroma mostren un increment en l'expressió de Bax i de p53, suggerint que l'augment en l'expressió de Bax podria ser regulada per la via de p53. En estadis finals de la formació de les plaques s'hi detecten cossos apoptòtics, que presenten alts nivells de Bax i activació de caspasa 3 (Kockx et al., 1998).

Quan una persona pateix una cardiopatia ateroscleròtica subjacent pot patir la oclusió aguda d'una artèria coronària amb certa freqüència, però casi mai es dona en una persona amb una circulació sanguínia normal. La oclusió es pot donar per varis processos, però els més freqüents són dos:

1. La placa d'ateroma causa un coàgul sanguini local, anomenat *trombus*, que obtura l'artèria. Si la placa d'ateroma travessa el vas sanguini i està en contacte directe amb la sang, sobre la placa s'hi aglutinen plaquetes i altres cèl·lules sanguínies, formant un coàgul que acabi taponant el vas (**Fig. 21**). A vegades el coàgul es desprèn i flueix a una branca més perifèrica de l'arbre coronari arterial, bloquejant l'artèria en aquest punt.

2. Es pot donar un espasme local d'una artèria coronària, causant també una oclusió coronària. L'espasme pot ser conseqüència de la irritació directe del múscul llis de la paret arterial pel contacte amb una placa ateroscleròtica (Guyton and Hall, 2001).

Immediatament després d'una oclusió coronària aguda, el flux sanguini s'interromp el els vasos coronaris més enllà de l'oclusió, excepte per petites quantitats que de flux col·lateral dels vasos del voltant. La part del múscul que no rep flux o que no en rep suficient com per a mantenir la funció del miocardi es diu pateix isquèmia, i s'anomena zona infartada. I el procés en conjunt és l'infart de miocardi (**Fig. 21**). Poc després del començament de l'infart es filtren a la zona infartada petites quantitats de sang col·lateral que fa que la zona s'ompli de sang estancada. Ràpidament les fibres musculars consumeixen tot l'oxigen, fent que l'hemoglobina quedi reduïda i de color blau fosc. A les poques hores d'absència casi total de flux sanguini, les cèl·lules moren. El teixit necròtic del centre de l'àrea lesionada serà substituït poc a poc per teixit fibrós durant els dies posterior a l'infart. En les primeres fases de la recuperació d'un infart de miocardi, els teixits que voregen

l'infart només reben la mínima quantitat de sang necessària per impedir la mort tissular. Qualsevol increment en l'activitat miocàrdica pot fer que el teixit normal privi al teixit marginal del seu rec sanguini, causant la mort isquèmica d'aquest teixit marginal. Al cap de setmanes o mesos, part del teixit miocàrdic no danyat s'hipertròfia per ajudar a normalitzar la funció cardíaca (Guyton and Hall, 2001).

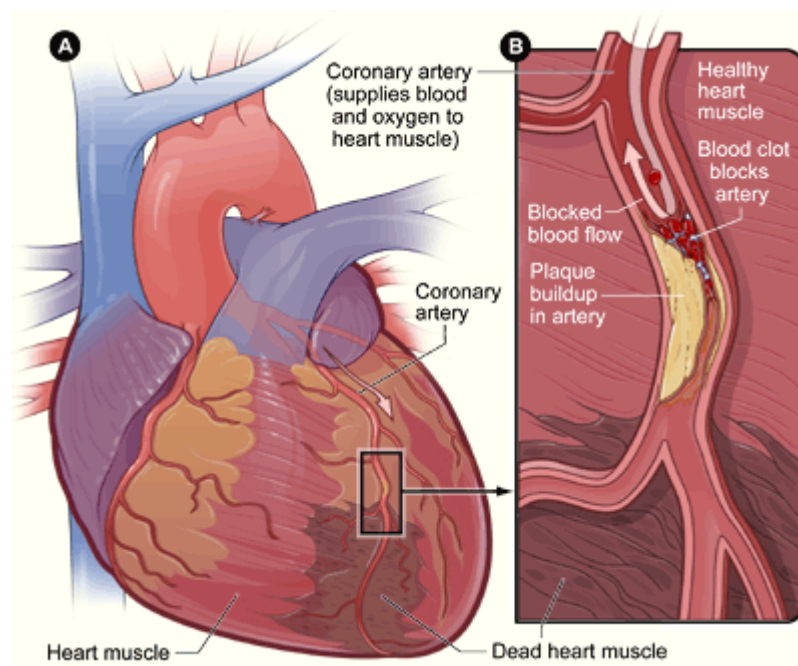


Figura 21. Isquèmia del miocardi. a) Visió general d'un cor i una artèria coronària danyats (amb mort de la musculatura cardíaca) degut a un atac de cor. b) Tall longitudinal de l'artèria coronària que pateix placa d'ateroma i coàgul sanguini que impedeix el flux sanguini (National Lung, Heart and Blood Institute, USA, 2006).

Diversos mecanismes moleculars s'han relacionat amb la resposta adaptativa del múscul cardíac en cors amb disminució de la funció cardíaca. L'autofàgia està augmentada en cors amb disfunció cardíaca per tal de protegir les cèl·lules de l'estrès hemodinàmic (Nakai et al., 2007). Biòpsies de pacients que pateixen cardiomiopatia isquèmica o cardiomiopatia dilatada presenten mort cel·lular per autofàgia dels cardiomiòcits, però no es detecta activació de caspases ni fragmentació d'ADN (TUNEL) (Knaapen et al., 2001).

En el ventricle esquerre explantat de pacients amb fracàs cardíac greu s'ha detectat citocrom c al citosol i activació de caspasa 8, però no obstant no s'observa activació de caspasa 3 ni tall dels seus substrats, el que suggereix que les vies

Introducció

intrínseques i extrínseques de mort no estan involucrades en la mort dels cardiomiòcits (Scheubel et al., 2002).

La proteïna antiapoptòtica ARC (Apoptosis repressor with CARD) s'ha demostrat que protegeix el cor durant la hipertensió i el dany per isquèmia i reperfussió en ratolins (Donath et al., 2006). Aquesta proteïna conté un domini CARD que presenta homologies amb els prodominis de les caspases apicals i amb el domini CARD de Apaf-1, i interacciona amb les caspases 2 i 8. El més remarcable és que ARC humà només s'expressa en la musculatura esquelètica i en el teixit cardíac (Koseki et al., 1998). Encara que al principi es creia que ARC només inhibia la via extrínseca, recentment s'ha demostrat que pot inhibir tant la via intrínseca com l'extrínseca de l'apoptosi, ja que interacciona amb Bax i amb diversos components de la via extrínseca en les línies cel·lulars humanes HEK293 i H9c2, una línia cel·lular derivada del cor (Gustafsson et al., 2004; Nam et al., 2004). Altres estudis mostren que ARC també pot protegir les cèl·lules del dany per isquèmia i reperfussió mitjançant mecanismes independents de caspases (Ekhterae et al., 1999; Neuss et al., 2001), suggerint que la protecció cardíaca dependent de ARC es dona per inhibició de caspases o per mecanismes independents de caspases segons l'estímul i el tipus cel·lular.

2.3.2 Altres patologies cardíques no isquèmiques

El terme *cardiomiopatia* literalment significa malaltia del múscul cardíac i és una de les principals causes d'insuficiència cardíaca i també el motiu més comú per a necessitar un trasplantament cardíac. La cardiomiopatia danya el to muscular del cor i redueix la capacitat de bombejar sang a la resta de l'organisme (Braunwald, 1997). En les cardiomiopaties la mort continuada de cardiomiòcits provoca la pèrdua progressiva de la funció del ventricle esquerre i al fracàs cardíac congestiu (condició en la que el cor no pot bombejar prou sang a la resta del cos).

2.3.2.1 Cardiomiopatia dilatada

La cardiomiopatia dilatada, o cardiomiopatia congestiva, és una malaltia del miocardi caracteritzada per la dilatació i el dany de la funció sistòlica del ventricle esquerre o d'ambdós ventricles (Karkkainen and Peuhkurinen, 2007) i ocasiona

debilitament i engruiximent del múscul cardíac, disminuint la funció cardíaca, cosa que afecta als pulmons, el fetge i d'altres sistemes de l'organisme (**Fig. 22**). Existeixen moltes causes de cardiomiopatia dilatada (deficiències nutricionals, malalties de la vàlvula cardíaca, anèmia, estrès, infeccions virals, alcoholisme i malaltia de l'artèria coronària) però en molts casos no es pot identificar la causa, pel que es sol anomenar cardiopatia dilatada idiopàtica (Braunwald, 1997).

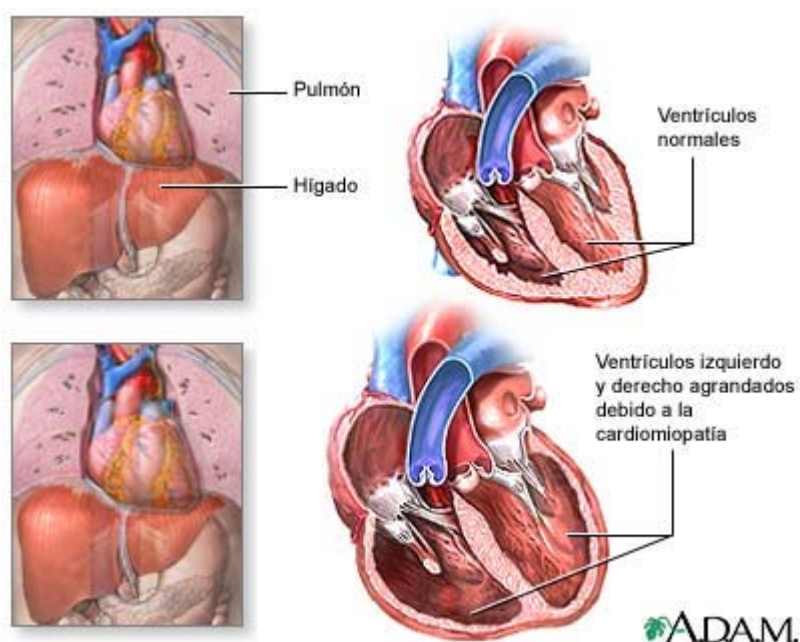


Figura 22. Cardiomiopatia dilatada. La cardiomiopatia dilatada implica un augment de la mida del múscul cardíac, i és el tipus més comú de cardiomiopatia. El múscul cardíac es debilita i no pot bombejar sang de forma eficaç. La funció cardíaca disminuïda afecta als pulmons, fetge i altres òrgans del cos (Biblioteca Nacional de Medicina dels Estats Units, 2007).

2.3.2.2 Cardiotoxicitat per fàrmacs

La cardiotoxicitat es dona en condicions on hi ha dany al múscul cardíac, degudes a l'ús de drogues quimioterapèutiques, a complicacions de l'anorèxia nerviosa o a l'administració incorrecta de determinades medicines. La cardiotoxicitat severa pot desembocar en cardiomiopatia quan el dany al múscul cardíac afecta a la funció de bombeig del cor (Yeh et al., 2004).

La cardiotoxicitat per drogues anticàncer ha estat ben estudiada en la família de les antraciclins (Mukhopadhyay et al., 2007; Panjrath et al., 2007). Els pacients poden presentar una cardiotoxicitat aguda en estadis inicials del tractaments, que es

Introducció

manifesten per anormalitats en l'electrocardiograma. Els efectes tardans del tractament en canvi són acumulatius, i poden provocar fracàs cardíac congestiu i disfunció del ventricle esquerre, degut a un dany cardíac directe causat per radicals lliures (Myers, 1998).

El dany al miocardi degut a l'ús prolongat d'antidepressius tricíclics s'ha estudiat des que es va detectar dany cardíac reversible en aquest tractament (Alexander and Nino, 1969; Acosta and Ramos, 1984). Es sap que aquests medicaments produeixen hipotensió, taucardies i canvis en l'electrocardiograma (U'Prichard et al., 1978; Weld and Bigger, 1980). Diversos estudis estadístics relacionen la depressió amb l'aparició d'una malaltia cardiovascular (Barefoot et al., 1996; Penninx et al., 2001; Roose, 2003), i estudis clínics no invasius han relacionat dany cardíac amb tractaments prolongats de determinats antidepressius tricíclics (Marti et al., 1995). Els trastorns depressius són comuns en pacients amb dany cardíac isquèmic, i augmenten seriosament el risc de patir més danys cardíacs, el que genera un fort debat a la comunitat mèdica sobre com tractar aquests trastorns depressius, tal com s'ha revisat a (Jiang and Davidson, 2005).

2.3.2.3 Cardiopatia alcohòlica

La cardiomiopatia alcohòlica és una forma de cardiomiopatia dilatada provocada per l'abús habitual d'alcohol. És un trastorn en el qual el consum excessiu i habitual d'alcohol debilita el múscul cardíac afectant a la capacitat de bombeig del cor. La cardiopatia alcohòlica fa que el múscul cardíac debilitat no bombegi sang de forma eficient portant a l'aparició d'una insuficiència cardíaca (Braunwald, 1997). S'ha demostrat l'efecte tòxic que el consum crònic d'alcohol té en el miocardi, i que l'aturada total del consum d'alcohol pot disminuir, o fins i tot fer desaparèixer, el dany al miocardi causat per l'alcohol (Obrador et al., 1994).

En la cardiomiopatia alcohòlica es pensava que només estava disminuïda la funció sistòlica del cor (Knochel, 1983). Però s'ha observat que la funció diastòlica es veu afectada en un terç dels pacients alcohòlics que tenen la funció sistòlica normal, i que en molts casos coexisteixen disfunció sistòlica i diastòlica (Fernandez-Sola et al., 2000). A més, l'excés en el consum d'alcohol no només afecta als cardiomiòcits, sinó que també afecta a la musculatura estriada (Rubin, 1979).

2.3.2.4 Rebuig del trasplantament cardíac

El trasplantament cardíac és un tractament mèdic complex que, gràcies a la utilització de medicaments antirebuig (immunosupressors), dona esperances a un grup de pacients que sinó moriria per insuficiència cardíaca. Els dos problemes més comuns pels quals es necessita un trasplantament cardíac són la malaltia ateroscleròtica coronària i la cardiomiopatia idiopàtica (Braunwald, 1997).

Durant els primers mesos després d'un trasplantament cardíac els pacients presenten marcadors de dany al miocardi (Ballester et al., 1990), en concret captació d'un anticòs antimiosina marcat amb Indi-111 (MAA) que és una tècnica no invasiva. Si al cap d'un any del trasplantament persisteix la captació de MAA el pacient té un alt risc de presentar rebuig (Ballester et al., 1990). La disminució de la captació de MAA al cap de 3 mesos del trasplantament s'associa l'absència de complicacions per rebuig, però si la captació de MAA al cor és el doble que als pulmons, utilitzats com a control, és un indicatiu de possibles complicacions futures en el pacient (Ballester et al., 1992).

2.3.3 Insuficiència cardíaca

El terme insuficiència cardíaca indica que el cor és incapaç de bombejar una quantitat suficient de sang per tal de satisfer les necessitats de l'organisme. La causa sol ser una disminució en la contractilitat del miocardi deguda a la disminució de la irrigació coronària, encara que també pot ser degut a la lesió de les vàlvules cardíques, pressió externa al voltant del cor, deficiència de vitamina B o a qualsevol altre anomalia que faci que el cor sigui una bomba ineficaç. Després d'un infart de miocardi l'organisme inicia un procés reparador natural per tal d'ajudar a restaurar la funció cardíaca normal. El múscul cardíac que no està lesionat s'hipertrofia, compensant en gran part la lesió cardíaca. Si la hipertrofia del teixit és excessiva, es pot produir una nova insuficiència cardíaca degut a que la vascularització coronària no sol augmentar igual que la massa muscular, i això fa que es desenvolupi una isquèmia relativa a mesura que el múscul s'hipertrofia, produint-se una insuficiència cardíaca (Guyton and Hall, 2001).

La oclusió coronària progressiva es dona quan l'aterosclerosi va constrenyent les artèries coronàries principals lentament al llarg de molts anys, i no de forma

Introducció

sobrada. En aquest cas es desenvolupen artèries col·laterals que aporten flux sanguini al teixit cardíac i pot ser que la persona no pateixi cap disfunció cardíaca. Si el procés escleròtic avança més enllà dels límits de la circulació col·lateral, el miocardi es veu greument limitat en la seva funció i el cor no pot bombejar la quantitat necessària de flux sanguini. Aquesta és una causa més d'insuficiència cardíaca (Guyton and Hall, 2001).

3. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA AL COR

Després d'un infart de miocardi, en l'àrea del cor que està infartada, s'hi ha detectat també, a part de la mort necròtica, mort cel·lular programada (MCP) dels cardiomiòcits (Gottlieb et al., 1994; Cheng et al., 1995; Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1996). Aquesta troballa de cardiomiòcits apoptòtics en el dany cardíac ha estimulat una intensa recerca dels mecanismes implicats en la MCP cardíaca en els últims anys, però encara avui no estan clars els mecanismes intracel·lulars implicats en la MCP durant la isquèmia.

Alguns treballs mostren un paper important de les vies de mort dependents de receptors de mort en condicions de isquèmia. En un model de isquèmia (20-25 minuts) i reperfussió (4 hores) en cors aïllats de rata i ratolí s'ha detectat la inducció de l'expressió de lligands de mort al cor durant la reperfussió, lligat a una detecció de fragmentació d'ADN per la reacció de TUNEL. Si es realitza aquest estudi en ratolins *lpr* (lymphoproliferative), que no expressen Fas funcional, la fragmentació d'ADN detectada per TUNEL disminueix (Jeremias et al., 2000). En cardiomiòcits de rata en cultiu, deprivats d'oxigen (hipòxia) i de sèrum (SD) es detecta activació de caspasa 3 i 8 després de 4 hores de tractament. La sobreexpressió o repressió de FADD en els cultius primaris de cardiomiòcits augmenta o reprimeix la fragmentació d'ADN detectada per electroforesi respectivament (Chao et al., 2002). Estudis amb FasL sobreexpressat en cultius primaris de cardiomiòcits han detectat fragmentació d'ADN nucleosomal per electroforesi. Utilitzant els ratolins *lpr*, en un model de isquèmia (30 minuts) i reperfussió (24 hores) *in vivo*, l'àrea infartada és menor (Lee et al., 2003). Aquests resultats donen importància a la via extrínseca en la mort dels cardiomiòcits durant el dany per isquèmia i reperfussió. Però en canvi, estudis *in vivo* similars amb ratolins *lpr* pretractats durant 24 hores amb l'inhibidor del porus de transició mitocondrial (PTM), Ciclosporina A, s'ha vist que l'activació de Fas té un paper minoritari, mentre que el dany mitocondrial juga un paper més rellevant en la mort cardiomiocitària després del dany per isquèmia i reperfussió (Gomez et al., 2005). Anteriorment ja s'havia vist la implicació del PTM en cors de rata *ex vivo* en tractaments de isquèmia sense reperfussió (Borutaite et al., 2003). En estudis de isquèmia (30 minuts) i reperfussió (2 hores) en cors aïllats del ratolí *knock out* per Bax, que indueix l'alliberament de citocrom c, s'observa una protecció parcial davant

Introducció

el dany per isquèmia i reperfussió (Hochhauser et al., 2003). Altres investigadors també han proposat la implicació de la via mitocondrial en l'apoptosi cardíaca, tal com s'observa en aquest article de revisió (Crow et al., 2004). L'obertura del PTM es considera que contribueix a la pèrdua de viabilitat associada a la reperfussió posterior a la isquèmia, encara que també podria tenir un paper durant la isquèmia (Di Lisa and Bernardi, 2006).

Alguns treballs que proposen que la mort dependent de caspases és minoritària al cor, i aposten per mecanismes independents de caspases per explicar la mort dels cardiomiòcits. El primer treball que va posar en dubte la implicació de les vies apoptòtiques en la mort dels cardiomiòcits treballava en cors de conill en isquèmia (30 minuts) i reperfussió (de 0 a 4 hores), on es va observar mort miocitària amb morfologia necròtica (inflament, condensació de la cromatina, ruptura de membrana plasmàtica) immediatament després de la isquèmia, mentre que la reacció de TUNEL no s'observava fins passades 2 hores de reperfussió (Ohno et al., 1998). En biòpsies de pacients en estadi terminal de cardiomiopatia isquèmica o cardiomiopatia dilatada s'han detectat incusions d'ubiquitina citosòliques que suggereixen mort cel·lular autofàgica dels cardiomiòcits (Knaapen et al., 2001). Els cardiomiòcits positius per TUNEL en aquestes biòpsies, que no presenten activació de caspasa 3 ni del marcador de necrosi C9, però en canvi sí mostren transcripció gènica activa, i presenten reacció de TUNEL inespecífica degut al pretractament amb proteïna K. El mateix estudi revela que en cors embrionals de ratolí sí que es detecta reacció TUNEL acompanyada d'activitat de caspasa 3, indicant que els cardiomiòcits embrionals moren de forma dependent de caspases (Knaapen et al., 2001). Estudis posteriors han demostrat que les incusions d'ubiquitina citosòlica en els cardiomiòcits isquèmics col·localitzen totalment amb marcatge específic de vacuoles autofàgiques, indicant una relació entre la via de degradació del proteasoma i la mort cel·lular autofàgica. La mort apoptòtica i necròtica en aquests pacients és minoritària (Kostin et al., 2003). La manca de la proteïna adaptadora Apaf-1 en els cardiomiòcits podria explicar la resistència cardíaca a les vies de mort dependents del mitocondri, tal com el nostre grup ha demostrat prèviament (Sanchis et al., 2003).

Diversos treballs remarquen la rellevància de la mort independent de caspases durant la isquèmia cardíaca (Kubasiak et al., 2002; Regula et al., 2002; Webster et

al., 2005). Aquests treballs proposen la implicació de la proteïna proapoptòtica de la família de Bcl2, BNIP3, l'expressió de la qual és induïda en condicions de hipòxia, en la mort dels cardiomiòcits durant el dany isquèmic. Treballs anteriors ja han revelat que BNIP3 pot induir dany mitocondrial interaccionant amb membres antiapoptòtics de la família de Bcl2 a la MME (Chen et al., 1997; Cizeau et al., 2000; Ray et al., 2000) o per obertura del PTM (Vande Velde et al., 2000). Tant en cardiomiòcits neonatals en cultius, com en cors de rata *ex vivo* i *in vivo* s'ha confirmat la inducció de BNIP3 en condicions de hipòxia, i els cardiomiòcits transfectats amb BNIP3 exogen moren en condicions de normòxia (Regula et al., 2002). No obstant, en altres treballs la sobreexpressió de BNIP3 no provoca la mort dels cardiomiòcits, que en canvi és induïda en condicions de hipòxia lligada a acidificació del medi. La mort cel·lular durant la hipòxia – acidosi implica fragmentació d'ADN, deguda a BNIP3, ja que la utilització d'un ARN *antisense* de BNIP3 evita completament la mort cel·lular programada dels cardiomiòcits (Kubasiak et al., 2002). El fet que BNIP3 indueixi fragmentació d'ADN tot i no tenir activitat endonucleasa ha estat descrit com a sorprenent (Vande Velde et al., 2000), inusual (Kubasiak et al., 2002) i paradoxal (Webster et al., 2005) per diferents investigadors, però encara es desconeix el mecanisme pel qual actua.

Altres estudis que proposen mort independent de caspases en el dany cardíac induït per isquèmia i reperfussió han revelat la implicació de l'homeostasi del calci en el dany tissular cardíac. En concret s'ha proposat que la reperfussió provoca una entrada de sodi a la cèl·lula, i que el calci acumulat activa les calpaïnes, proteases en cisteïna activades per calci, que al seu torn poden tallar Bid. tBid pot provocar disfunció mitocondrial i alliberament de factors proapoptòtics, que causen fragmentació d'ADN i mort cel·lular. Així doncs, segons aquest estudi, la mort cardiomiocitària en isquèmia i reperfussió es independent de caspases, però dependent de calpaïnes i de la disfunció mitocondrial (Chen et al., 2002). Altres estudis han confirmat la implicació de les calpaïnes en el dany per isquèmia i reperfussió *in vivo*, ja que s'ha observat que la inhibició de calpaïnes protegeixen el miocardi (Khalil et al., 2005). La mort cel·lular durant la reperfussió cardíaca s'ha relacionat amb l'entrada de calci a través de l'intercanviador sodi/calci, secundària a un increment de la concentració de sodi intracel·lular. Recentment s'ha postulat que

Introducció

L'activitat calpaïna és la responsable del dany a la bomba sodi/potassi, dany que ja es detecta al cap de 5 minuts de reperfussió; i que aquest efecte és degut a la degradació per part de les calpaïnes de les proteïnes d'ancoratge al citoesquelet de la bomba sodi/calci (Inserte et al., 2005). A més a més, l'increment en les concentracions de calci citosòlic agreuja el dany mitocondrial ja que augmenta la permeabilitat transitòria mitjançada per ciclofilina D (Baines et al., 2005).

Estudis en diferents models animals, *in vivo* o *ex vivo*, utilitzant inhibidors de caspases donen diversitat de resultats. En models de isquèmia i reperfussió *in vivo*, en rates i gossos, s'ha observat disminució de la mida de l'infart a cap de 24h de reperfussió per tractaments amb els inhibidors, zVAD i ATA (àcid aurintricarboxílic), respectivament (Yaoita et al., 1998; Zhao et al., 2003). No obstant, en 3 hores de reperfussió tan sols s'observa inhibició dels marcadors apoptòtics (TUNEL i fragmentació d'ADN) però no hi ha reducció de la grandària de l'infart (Okamura et al., 2000). Utilitzant un model de isquèmia i reperfussió en cors de rata *ex vivo*, mitjançant l'ús de l'inhibidor de caspasa 3, DEVD, s'observa recuperació parcial de la contractilitat al cor, però no es veu afectat el nombre de cardiomiòcits que presenten senyalització de TUNEL o fragmentació d'ADN (Ruetten et al., 2001). Aquests resultats porten a pensar que l'activitat caspasa no està implicada en la mort cardiomiocitària en sí, sinó potser en la propagació del dany després de l'infart, durant el període de reoxigenació. La utilització de inhibidors de caspases durant 28 dies després d'un infart de miocardi, en rates, disminueix la disfunció cardíaca i atenua la remodelació ventricular (Chandrashekhar et al., 2004), suggerint que la mort dependent de caspases detectada podria estar relacionada amb la mort dels fibroblasts cardíacs responsables de la formació de la cicatriu fibrosa al cor després d'un infart de miocardi.

Així doncs, en els darrers 10 anys estudis moleculars i genètics han evidenciat que la mort dels cardiomiòcits es un procés crític en el dany cardíac lligat a moltes patologies cardíques (Foo et al., 2005), per les que fins llavors s'havien proposat mecanismes diversos, com ara dessensibilització dels receptors β -adrenèrgics (Lefkowitz et al., 2000), alteracions del citoesquelet (Chien, 1999), canvi de les isoformes de miosina (Nakao et al., 1997) o disfuncions energètiques (Kelly and Strauss, 1994; Taegtmeier, 2002). A pesar que s'ha establert el lligam entre les

patologies cardíaques i la mort dels cardiomiòcits, el mecanisme molecular precís que regula la mort dels cardiomiòcits no està clar, i entendre aquest mecanisme és indispensable per a poder dissenyar teràpies per evitar la mort cardiomiocitària en el futur.

Objectius

OBJECTIUS

1. Aprofundir en els mecanismes que confereixen resistència a la mort dependent de caspases al miocardi, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de la maquinària de mort cel·lular dependent de caspases en els cardiomiòcits en condicions control i en condicions d'estrès.
2. Esbrinar els mecanismes implicats en la mort induïda per isquèmia en els cardiomiòcits, mitjançant l'estudi sistemàtic de les vies apoptòtiques conegudes en un model cel·lular de isquèmia.
 - a. Funció de les molècules proapoptòtiques conegudes independents de caspases alliberades del mitocondri en condicions d'estrès, AIF i EndoG.
 - b. Anàlisi d'altres nucleases candidates que han estat relacionades amb l'activitat d'EndoG en la bibliografia: Fen-1, DNAses de tipus I i II, Topoisomerasa de tipus II, TatD i Exosc5.
 - c. Esbrinar la relació entre BNIP3 i EndoG, dues proteïnes mitocondrials apoptòtiques implicades en el processament de l'ADN induït per isquèmia.

Materials i Mètodes

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

1.1 CULTIUS CEL·LULARS

1.1.1 Cultiu de cardiomiòcits embrionals de rata

Els cardiomiòcits embrionals de rata s'obtenen de rates a 16 dies de gestació (e16) sacrificades seguin les guies de procediments ètics nacionals i europees. S'extreuen els cors d'embrions e16 i es col·loquen 5 o 6 cors en tubs de 15ml amb 1 ml de solució d'ADS (solució salina glucosada tamponada). S'afegeixen 10µl de col·lagenasa tipus 2 (10U/µl, Worthington) i 1µl de DNAsa I de pàncreas boví (10mg/ml, Roche). S'incuba durant 15 minuts en un bany a 37°C sota la campana, pipetejant suaument tota l'estona amb una punta de 1ml. En acabar, s'agafa el sobrenedant, descartant els trossos de teixit que quedin, s'hi afegeix el doble de volum de medi per a inactivar la col·lagenasa i es centrifuga 4 minuts a 800rpm. Es descarta el pellet i es resuspèn el sobrenedant en 1 ml de medi base ($\frac{3}{4}$ Medi DMEM, 1g/l glucosa, GIBCO - $\frac{1}{4}$ Medi EARLES M199, GIBCO - 10% Sèrum de cavall (HS) - 5% Sèrum fetal boví inactivat per calor (FBS_{hi}) - 10 mM HEPES). Es plaquegen les cèl·lules en plaques no tractades durant 45 minuts. A continuació es recull el medi, que conté les cèl·lules en suspensió, i es transfereix a un tub on afegim 1ml de medi complert (medi base suplementat amb 1µM insulina, 10nM EGF i 1ng/ml cardiotrofina-1 de ratolí). Es compten les cèl·lules, es sembren en plaques pretractades amb col·lagen de tipus I (100 µg/ml en àcid acètic 0,02M, BD), i es mantenen a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂.

1.1.2 Cultiu de cardiomiòcits neonatals de rata

Els cardiomiòcits neonatals de rata s'obtenen a partir de cries de rata Spraley-Dawson de entre 2 i 4 dies (un o dos parts). S'extreuen els cors de forma més asèptica possible i es col·loquen en una placa amb solució d'ADS en gel. Es dissequen les aurícules i els vasos sanguinis visibles sota la lupa i es treu el màxim de pericardi que rodeja el cor i es passen els cors a una nova placa d'ADS. S'obren els ventricles i es trossegan per facilitar la posterior digestió i s'agrupen els cors de 4 en 4 en eppendorfs amb 1 ml d'ADS i 12µl de col·lagenasa tipus 2 (10U/µl, Worthington). Es faran tres cicles de digestió a 37°C i en agitació. Després de cada cicle es recupera el sobrenedant que té les cèl·lules disgregades afegint-hi el doble de

Materials i Mètodes

volum de medi complet per aturar la digestió. Aquestes suspensions cel·lulars es centrifuguen i es resuspenen en medi complet. La suspensió de cèl·lules resultant es sembla en plaques de Petri de 10cm (p100) sense tractar durant 45 minuts al incubador a 37°C, en atmosfera humida al 5% CO₂. Es recupera el medi i es torna a sembrar de forma idèntica a l'anterior. Durant aquesta etapa s'enriqueix la suspensió en cardiomiòcits, ja que són el tipus cel·lular amb menys afinitat pel plàstic sense tractar. A la placa que descartem hi resten adherits els fibroblasts cardíacs, que es cultiven seguint el protocol de l'Apartat 1.1.4. Després de la segona incubació es recupera el medi, es centrifuga i es resuspenen les cèl·lules en medi complet. Els cardiomiòcits es sembren en medi complet (¾ Medi DMEM, 1g/l glucosa, GIBCO - ¼ Medi EARLES M199, GIBCO - 10% HS - 5% FBS_{hi} - 10 mM HEPES) a una concentració de 80.000 cèl·lules/cm² en plaques pretractades amb 0,1% gelatina (Tipus A, de pell porcina, Sigma) durant almenys 1 hora a temperatura ambient. Els cultius es mantenen a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂. Els cultius es tracten al cap de 48 hores, excepte en els tractaments que requereixen transducció lentiviral, que es mantenen durant més temps. En els tractaments llargs es canvia el medi al cultiu cada 48 hores.

1.1.3 Cultiu de cardiomiòcits adults de rata

Els cardiomiòcits de rata s'obtenen de una rata mascle d'entre 20 i 30 setmanes d'edat. Un cop dissecat el cor es penja per l'aorta en el sistema de perfusió de Langerdorff. Es perfundeix el cor per a netejar-lo de sang en tampó de reperfusió (Tr) (NaCl 115mM, Glucosa 11mM, NaHCO₃ 6mM, KCl 2,6mM, MgSO₄ 1,2mM, KH₂PO₄ 1,2mM) durant 20 minuts. S'afegeix col·lagenasa A (Roche) a una concentració final de 0,2% al tampó de reperfusió i progressivament es va augmentant la concentració de calci per tal d'evitar que els cardiomiòcits s'hipercontreguin (concentració final de Ca⁺² 1mM). Un cop finalitzada la reperfusió, s'eliminen l'aorta i les aurícules i es trossegueix els ventricles en el tampó de reperfusió amb 1,3% de BSA (albúmina de sèrum boví). L'homogenat obtingut es remou amb una pipeta durant 7 minuts, bombollejant al mateix temps amb carbogen (barreja dels gasos CO₂ i O₂), i es centrifuga a 100g. El pellet es resuspèn en tampó de reperfusió amb 0,025% de tripsina 1:250 de pàncreas boví (Sigma) i,

mentre es bombolleja també amb carbogen, es remou suaument amb una pipeta pasteur de plàstic durant 7 minuts. A continuació es centrifuga a 100g i el pellet es resuspèn en tampó d'enriquiment (Tr al 4% de BSA), que permet descartar les cèl·lules amb la membrana danyada, i es centrifuga a 100g. Finalment, el pellet obtingut es resuspèn en medi complert (medi HANK M199 0,35g/l NaHCO₃, sense glutamina (SIGMA), suplementat a NaHCO₃ 2,2g/l, BSA 0,2%, HEPES 10mM, Creatinina 5mM, L-carnitina 2mM, Ara-C 10µM, Insulina 10⁻⁷M) i es sembra a una densitat de 20.000 cèl·lules/cm² en plaques pretractades amb 0,5µg/cm² de laminina natural de ratolí (Invitrogen), mantenint-se a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂. Al cap de 4 hores de la sembra se'ls hi canvia el medi per tal d'eliminar les cèl·lules i restes de teixit que no s'han adherit a la placa, i es mantenen en cultiu a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂. Els tractaments s'inicien a les 24 hores del cultiu (Ravassa et al., 2000).

1.1.4 Cultiu primari de fibroblasts cardíacs, de pell i de pulmó

Per a l'obtenció de fibroblasts cardíacs es parteix de la primera placa p100 sense tractar on s'ha sembrat la suspensió cel·lular de cèl·lules cardíques durant 45 minuts, i que posteriorment es descarta en el cultiu de cardiomiòcits neonatals (Apartat 1.1.2). S'afegeix medi complert de fibroblasts (medi DMEM, 4,5g/l glucosa, GIBCO - 10% FBS_{hi}) a la placa, i es cultiva durant 2-3 dies fins arribar a confluència en un incubador a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂.

L'obtenció dels fibroblasts de pell i de pulmó es fa a partir de cries de rata Spraley-Dawson de entre 2 i 4 dies, en paral·lel a l'obtenció de cardiomiòcits neonatals, i utilitzant les mateixes cries. S'obtenen trossos de la pell de l'esquena i trossos de pulmó, que es col·loquen en plaques amb solució d'ADS (solució salina glucosada tamponada) en gel, es trosseguen i s'agrupen en tubs eppendorff amb 1 ml de solució ADS i 12µl de col·lagenasa tipus 2 (10U/µl, Worthington). Es faran només dos cicles de digestió a 37°C i en agitació. Després de cada cicle es recupera el sobrenedant, que conté les cèl·lules disgregades, i s'hi afegeix el doble de volum de medi complert de fibroblasts per aturar la digestió. Aquestes suspensions cel·lulars es centrifuguen, es resuspenen el pellet en medi complert, i es sembren tantes plaques p100 com nombre de cries del qual hem partit.

Materials i Mètodes

Un cop els cultius de fibroblasts estan confluents cal dividir-los per a mantenir el cultiu, que es pot dividir fins a 4-5 vegades. Els tractaments es realitzen entre la divisió 2 i la 4. Es retira el medi del cultiu i es renta amb PBS 1x a 37°C, s'afegeixen 2 ml de Tripsina per placa, i s'incuba 5 minuts a 37°C. S'afegeixen 8 ml de medi complert per a inactivar la tripsina, i es centrifugen 4 minuts a 130g. Es resuspèn el pellet de cèl·lules en medi fresc, i es sembra a una proporció de 3 plaques p100 per cada p100 original.

1.1.5 Línia cel·lular HEK293T

La línia cel·lular humana de cèl·lules de ronyó embrional, HEK293T, és un bon model per sobreexpressar i obtenir proteïnes cel·lulars i extracel·lulars, secretades o de membrana. Aquesta línia cel·lular expressa l'antigen T de SV40, permetent la replicació episomal de plàsmids que continguin la regió promotora SV40. La línia cel·lular HEK293T es cultiva en Medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementat amb 10% FBS_{hi}, 10% d'aminoàcids no essencials (NEAA, GIBCO), 1mM Piruvat sòdic (GIBCO), i es mantenen a 37°C, en atmosfera humida al 5% de CO₂. Per al manteniment de la línia es renta la placa de cèl·lules en tampó fosfat salí (PBS), es desenganxen les cèl·lules amb Tripsina-EDTA (GIBCO) a temperatura ambient, s'inactiva la tripsina amb medi amb sèrum, i es recullen per a centrifugar-les a 130g durant 4 minuts. Es dilueixen entre 1:10 i 1:15 en plaques de cultiu de 100mm de diàmetre (p100) i es sembren en plaques no tractades en el seu medi. Per a realitzar les experiments de transfecció les cèl·lules es cultiven en plaques pretractades amb gelatina 0,1% (Tipus A, de pell porcina, Sigma) durant 20 minuts a temperatura ambient, així millora l'eficàcia de transfecció perquè es prevé que es desenganxin de la placa.

1.1.6 Congelació i descongelació de línies cel·lulars

Un cop s'ha rentat les cèl·lules en PBS, es tripsinitzen i es centrifuguen a 130g durant 4 minuts. S'aspira el medi i es resuspèn el pellet de cèl·lules en medi de congelació (90% de FBS_{hi} i 10% DMSO estèril (Sigma)) a una concentració de 10⁶ cèl·lules/ml. Ràpidament es posa 1ml de les cèl·lules en medi de congelació en un vial roscat de congelació i es manté dins d'un termos a -80°C durant 24h, passades

les quals es col·loquen els vials en N₂ líquid. Així la temperatura va baixant gradualment, augmentant la supervivència.

Alhora de descongelar una línia cel·lular, es treu el vial del N₂ líquid i es posa immediatament en un bany a 37°C, un cop està descongelat es renten les cèl·lules en medi complert i es centrifuguen 4 minuts a 130g per tal d'eliminar el DMSO del medi. Es resuspenen en medi de cultiu i sembren en una placa de cultiu, on controlarem el seu creixement, i no es dividiran fins que siguin confluents.

1.1.7 Inducció de isquèmia en cultius cel·lulars

Per a la inducció de isquèmia experimental en cultius cel·lulars, aquests s'incuben en solució de Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O, 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, CaCl₂·2H₂O 0,9 mM, MgCl₂·6H₂O 0,5 mM) (Tatsumi et al., 2003) i en una atmosfera amb pressió parcial d'oxigen baixa (atmosfera hipòxica). Per tal d'aconseguir condicions hipòxiques en els cultius al inici d'aquest treball s'utilitzava la cambra hipòxica de Billups-Rothenberg amb una barreja de 5% de CO₂ i 95% N₂, que segons les instruccions del fabricant aconseguia una concentració d'oxigen de 0,1%, encara que no és mesurable. Posteriorment hem disposat d'una campana hipòxica (Hypoxia workstation invivo2 400, Biotrace) que permet el manteniment de la pressió parcial d'oxigen controlada al 0,2%, amb un 5% de CO₂ i la resta de la barreja amb nitrogen i una temperatura controlada de 37°C. La principal diferència és que la cambra hipòxica provoca un augment de pressió al seu interior, cosa que la campana hipòxica no causa, fet que pot agreujar el fenotip observat en els cardiomiòcits isquèmics. Hem verificat que els experiments realitzats amb el model vell es repeteixen utilitzant el model nou però de forma menys severa, aquest canvi possiblement és degut a la disminució de l'excés de pressió, un possible element d'estrès cel·lular que s'ha eliminat en el model nou de campana hipòxica.

1.2 RECOMPTE CEL·LULARS

1.2.1 Recompte de viabilitat amb Blau Tripà

El reactiu Blau Tripà és un colorant vital, que s'utilitza per tenyir de blau selectivament les cèl·lules mortes. En contacte amb cèl·lules vives, amb la membrana plasmàtica intacta, aquestes el poden expulsar activament, de manera que es

Materials i Mètodes

mantenen incolores. Aquest mètode no distingeix entre cèl·lules mortes per apoptosi o per necrosi. Els cardiomiòcits es planten en plaques de Petri 3,5cm. Un cop finalitzat el tractament, les cèl·lules són tripsinitzades i resuspeses en 100 µl de PBS (8g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24g/l KH₂PO₄, 1,44g/l Na₂HPO₄, pH 7,4 HCl). S'afegeix a la suspensió de cèl·lules el colorant de blau tripà (Sigma) a una concentració final de 0,1%. 10 µl de la suspensió de cèl·lules resultant es compta a la cambra de Burker. Es recompten dues plaques per tractament, i cada experiment es fa per triplicat. Els recomptes s'han fet en un microscopi òptic invertit Olympus IX70. Els resultats s'expressen com al total de cèl·lules vives respecte el total de cèl·lules per punt ± S.E. d'aquest valor.

1.2.2 Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst i immunocitoquímica anti-caspasa 3 activa

El reactiu Hoechst 33258 o Bisbenzimidazol ([2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroclorid]) és un compost fluorescent que s'uneix a l'ADN i que es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. Pot tenyir tant cèl·lules vives com fixades, ja que degut a la seva estructura molecular, pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules intactes (Churchill and Suzuki, 1989). Les cèl·lules es planten en plaques de 4 pous (NunClon) i, un cop acabat el tractament, es fixen en PBS al 4% de paraformaldehid (PFA) durant 15 minuts. Després de tres rentats en PBS es permeabilitzen les cèl·lules en solució de permeabilització (PBS al 2% BSA, 0,1% de Tritó X-100 i 2% HS) durant 1 hora a temperatura ambient. La solució d'anticòs primari anti-caspasa 3 activada (Cell Signaling) es prepara en tampó de permeabilització a una dilució 1:500, i s'incuba durant 2 hores a temperatura ambient. Després de tres rentats en solució de permeabilització, s'incuba amb l'anticòs secundari anti-conill conjugat a Alexa Fluor 594 (Molecular Probes), preparat a una dilució 1:500 en el mateix tampó, durant 1 hora a les fosques. A continuació es fan 3 rentats més en PBS i es tenyeixen amb 0,5 µg/ml de colorant Hoechst durant 20 minuts a temperatura ambient. Finalment es s'afegeix medi de muntatge Vectashield (Vector) a cada pou i es cobreix amb un cobreobjectes. El recomptes s'han fet en un microscopi òptic invertit amb epifluorescència Olympus IX70. Per a determinar la mort apoptòtica es consideren

aquelles cèl·lules que presenten activació de caspasa 3 juntament amb condensació de la cromatina nuclear (Veure exemple en la **Fig. 23**).

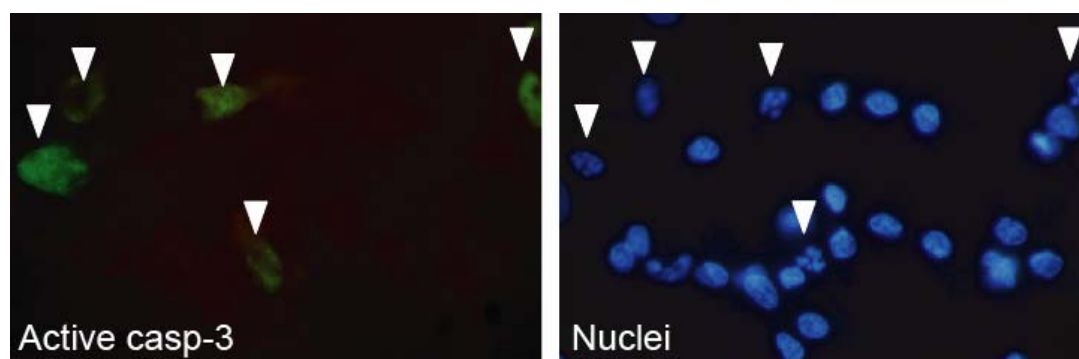


Figura 23. Exemple de cardiomiòcits embrionals de rata amb immunodetecció de caspasa 3 activa i tinció nuclear de Hoescht. Imatges en microscopi Olympus IX70. Per al recompte de mort apoptòtica es compten les cèl·lules que presenten condensació de la cromatina juntament amb activació de caspasa 3.

1.3 TINCIONS CEL·LULARS

1.3.1 Tinció de TUNEL

La reacció de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) és una tècnica molt utilitzada per a detectar fragmentació d'ADN deguda a l'activitat de la nucleases apoptòtiques, CAD i EndoG. L'assaig es basa la presència de discontinuïtats en l'ADN que són reconeguts per l'enzim transferasa terminal de dUTPs, i que transfereix dUTPs marcats fluorescentment als talls en l'ADN.

L'assaig de TUNEL es realitza en cèl·lules fixades amb PFA 4% durant 20 minuts i permeabilitzades amb 0,1% de Tritó X-100 al 0,1% de citrat sòdic durant una hora a 4°C. La reacció de TUNEL es fa segons les instruccions del fabricant (In Situ Cell Death Detection Kit, Sigma). En acabar la reacció, es renta amb PBS i s'afegeix el colorant Hoechst 33258 a una concentració final de 0,05 µg/ml durant 20 minuts. El recompte de cèl·lules positives a la reacció de TUNEL es fa utilitzant un microscòpic òptic El recomptes s'han fet en un microscopi òptic invertit amb epifluorescència Olympus IX70. Resultats expressats en percentatge de cèl·lules positives per TUNEL respecte el nombre total de cèl·lules per pou.

1.4 ASSAIGS D'ACTIVATS ENZIMÀTIQUES

1.4.1 Assaig d'activitat de caspases executores i de caspasa 8

S'utilitzen respectivament els substrats fluorescents Z-DEVD-AFC i Z-IETD-AFC per a la detecció de l'activitat de les caspases executores i de la caspasa 8 iniciadora. Un cop finalitzat el tractament de les cèl·lules, es desenganxen de la placa, es renten dues vegades amb PBS fred i es lisen les cèl·lules en tampó per a l'activitat DEVD o "caspase-3-like" (20mM Hepes/NaOH (pH 7,2), 5mM MgCl₂, 5mM EDTA, 1% PMSF, 10mM DTT) o en tampó per a l'activitat IETD o "caspase-8-like" (20mM Hepes/NaOH (pH 7,2), 150mM NaCl, 10mM DTT i 1mM PMSF). A ambdós tampons s'hi afegeix 1% de Tritó X-100. La lisi es duu a terme a 4°C, en agitació orbital, durant 20 minuts. En acabar la lisi es centrifuga 5 minuts a màxima velocitat i es recupera el sobrenedant. La concentració de proteïnes en el lisat es quantifica pel mètode de Lowry. S'agafen 25µg (assaig caspasa 3) o 100 µg (assaig caspasa 8) de proteïna en el mateix tampó de lisi i s'hi afegeix 10% Sacarosa, 0,1% CHAPS i 50µM de substrat fluorogènic. L'assaig d'activitat es fa en plaques de 96 pous, que s'incuben 12 hores a 37°C. S'utilitza el fluorímetre Bio-Tek FL 600 (Izasa, Espanya) per detectar la fluorescència a 360nm (40nm d'amplitud de longitud d'ona) d'excitació i 530nm (25nm d'amplitud de longitud d'ona) d'emissió.

1.5 PRODUCCIÓ DE LENTIVIRUS

1.5.1 Transfecció amb polietilenamina (PEI)

La majoria de membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, essent molt difícil que molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin atravessar-les. Els lípids catiónics, com la polietilenamina, condensen l'ADN plasmídic neutralitzant les càrregues negatives i protegint-lo de l'acció de DNAses els agregats resultants tenen alta afinitat per les cèl·lules, donant una alta efectivitat de transfecció. La polietilenamina (PEI, Sigma) s'utilitza des de 1995 com a vector de concentració (Florea et al., 2002) i presenta l'avantatge que no requereix alta confluència en el cultiu i que al ser més econòmic permet l'utilització en experiments a major escala. El principi bàsic es pot obtenir de Sigma, tot i que requereix un protocol de dissolució una mica complex. També es poden aconseguir preparats comercials per transfecció basats en PEI.

La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics. Diluïm 5 µl de PEI 1x (10 µM) per cada µg d'ADN a transfectar en un volum de solució salina estèril (NaCl 150 mM) 4 cops superior al volum de PEI requerit. Per exemple, si es volen transfectar 2 µg d'ADN, cal diluir 10 µl de PEI en 40 µl de solució de NaCl. L'ADN es dilueix també en solució estèril de NaCl 150 mM en el volum final en què està diluït el PEI (en l'exemple seria 50 µl). S'afegeix la solució de PEI damunt la de l'ADN i es vorteja durant 1 minut, la barreja es deixa reposar durant 10 minuts a temperatura ambient durant els quals es formen els complexos de PEI i ADN. La solució de transfecció s'afegeix damunt la placa de cultiu a transduir gota a gota. Entre 3 hores i 16 hores després de la transducció es canvia el medi que conté els complexos per medi complet.

1.5.2 Producció de lentivirus en la línia cel·lular 293T

Es planten les cèl·lules HEK293T a una concentració de $3,5 \times 10^6$ cèl·lules per placa p100 en medi complet de HEK293T (veure Apartat 1.1.5) en plaques pretractades amb gelatina 0,1% durant 20 minuts, essent desitjable partir d'almenys 2 o 3 p100s per l'obtenció de cada virus diferent per tal d'augmentar l'eficàcia del procés de concentració dels virus posterior. L'endemà es canvia el medi per medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum i es mantenen les cèl·lules en repòs a l'incubador a 37°C durant almenys una hora mentrestant es prepara la barreja de transfecció.

Es transdueix un total de 40 µg d'ADN per placa, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 3:2:1. És a dir, 20 µg del plàsmid lentiviral (pLVTHM amb l'RNAi corresponent o pEIGW amb el gen a sobreexpressar), 13 µg del plàsmid empaquetador psPAX2 i 7 µg del plàsmid pMD2G que codifica per l'embolcall víric (cedits pel Dr. Trono). Cal un total de 200 µl de lípid PEI per a transduir 40 µg d'ADN (a una raó de 5 µl de PEI per cada µg d'ADN). Tant l'ADN com el lípid PEI es resuspenen en 1 ml de solució NaCl 150mM estèril. S'afegeix la solució de PEI sobre la solució d'ADN i es vorteja immediatament durant 1 minut. Es deixa reposar la barreja a temperatura ambient durant 10 minuts, passats els quals s'afegeix la barreja gota a gota a la placa de HEK293T, i es deixa a l'incubador durant 3 hores. Transcorregudes 3 hores, s'aspira el medi sense sèrum ni antibiòtic que conté el PEI i l'ADN a la campana de seguretat BioIIA i s'afegeix medi complet

de HEK293T. A partir de 24 hores el medi ja conté nombrosos virus, que es poden recollir i reemplaçar amb medi nou durant 24 hores més o recollir només el medi a les 48 hores. Segons l'eficàcia de transducció del model cel·lular es poden transduir els cultius directament amb aquest medi o, com és el nostre cas, cal centrifugar el medi per a concentrar-los.

1.5.3 Concentració dels lentivirus i emmagatzematge

Tot el procés de concentració dels lentivirus es duu a terme dins la campana de seguretat BioIIA, i tenint molta cura de no disseminar els virus. El medi recollit que conté els virus es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0,45 µm, per així eliminar qualsevol cèl·lula del cultiu que pugui haver quedat en el medi i que potencialment pugui contaminar el cultiu a transduir a posteriori.

Un cop filtrat el medi amb els virus, es centrifuga a 50000g durant 3 hores a 4°C, preferiblement en tubs d'un sol ús per a major seguretat. El pellet obtingut és poc compacte, així que s'aspira el medi suaument, es resuspenen els virus en una solució estèril de PBS al 1% de BSA, a raó de 30 µl per cada placa p100 de partida, i es congelen a -80°C en alíquotes de treball fins a la seva utilització.

1.5.4 Transducció cultius primaris mitjançant lentivirus

Un cop finalitzat el cultiu cardiomiòcits neonatals de rata es sembren les cèl·lules en plaques de 35mm de diàmetre (p35) pretractades amb gelatina 0,1% i en presència de Mitomicina C (10µg/ml). Al cap de 4 hores es canvia el medi amb mitomicina C i, després de fer un rentat amb PBS 1x estèril a 37°C es posen els cardiomiòcits en medi complert. A cada p35 se li afegeixen 20µl de la solució de lentivirus concentrats a la campana dins la campana de seguretat BioIIA. Es deixen els cardiomiòcits en contacte amb els virus durant 24h, quan aspirem el medi amb els virus dins la campana BioIIA i el reemplaçem per medi complert fresc.

Per a la transducció dels cardiomiòcits per a sobreexpressió, es mantenen els cardiomiòcits en cultiu durant 4 dies després de la transducció (que es realitza el mateix dia del cultiu), i llavors s'inicia el tractament. Quan els cardiomiòcits es transdueixen amb una construcció per a shRNAi (short RNA interference), es

mantenen en cultiu durant 6 dies, que és el que tarda en reduir-se l'expressió del gen en estudi, canviant el medi cada 2 dies, i llavors s'inicia el tractament.

2. TÈCNIQUES DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

2.1. ESTUDI DE LA INTEGRITAT DE L'ADN

En acabar cada tractament es recuperen les cèl·lules, rasant-les en el medi del tractament i centrifugant. En el tractaments en tampó de Tirode, es guarda directament aquest pellet, si les cèl·lules estaven en medi amb sèrum, es renta el pellet amb PBS 1x, es centrifuga de nou, i es guarden tots els pellets a -80°C fins al moment de fer l'extracció d'ADN. L'extracció de l'ADN dels punts procedents d'un mateix experiment es processen alhora.

Els pellets es resuspenen en 40µl de PBS a temperatura ambient i s'hi afegeixen 40µl agarosa fosa (agarosa amb punt de fusió baix, Sigma) al 1% en tampó TBE 0,5x (45mM Tris pH 8,3, 45mM àcid bòric i 1mM EDTA). Cada barreja s'afegeix a un motlle rectangular i es deixa solidificar. Cada bloc d'agarosa s'incuba en 1ml de tampó de lisi (10mM Tris pH 8, 1% de lauril-sarcosil, 0,5mM EDTA i 100µg/ml de proteïnasa K de Sigma) a 50°C durant 24 hores. Es recupera el tampó de lisi per a l'obtenció de l'ADN de baix pes molecular i els blocs d'agarosa es renten dues vegades amb tampó TBE 0,5x a temperatura ambient. Per a l'anàlisi de la degradació de l'ADN de pes molecular alt es carreguen els blocs d'agarosa en un gel d'agarosa (especial per a migrar CHEF, Sigma) en TBE 0,5x al 1% tenyit amb SYBR Safe (Invitrogen). L'electroforesi en camp pulsant es realitza en el sistema CHEF DR-II de la casa Biorad. Es migra durant 14 hores, a voltatge de 6V/cm, amb un interval de temps des de 5 segons a 50 segons a 4°C. S'observa per exposició a UV i es fotografia el gel amb una càmera digital Kodak DC290 (**Fig. 24**).

En el tampó de lisi que hem recuperat dels blocs d'agarosa podem analitzar la degradació d'ADN de pes molecular baix. Es precipita l'ADN present en el tampó de lisi afegint un volum d'etanol i incubant durant 16h a -20°C, i es centrifuga. El pellet d'ADN es renta amb etanol 70% estèril i es torna a centrifugar. El pellet final es dilueix en 20 µl de TE (10mM Tris pH8, 1mM EDTA i 10 µg/ml de RNAsa). S'analitza per electroforesi convencional en gel d'agarosa 2%, tenyit amb SYBR Safe (Invitrogen), s'observa per exposició a UV i es fotografia el gel amb una càmera digital Kodak DC290 (**Fig. 24**).

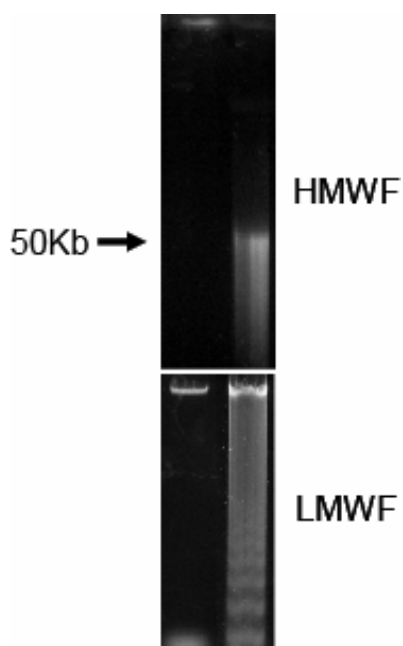


Figura 24. Exemple de fragmentació d'ADN d'alt pes molecular (HMWF) i de baix pes molecular (LMWF), en fibroblasts de pell control (primer carril) i en isquèmia (segon carril).

2.2 CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES

En enginyeria genètica, es considera un vector a una molècula d'ADN que pugui utilitzar-se per introduir una seqüència d'ADN en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plàsmid o un genoma viral. Els plàsmids són petites molècules d'ADN circular extracromosòmic que es troben a molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i poden haver-hi múltiples còpies del plàsmid en una mateixa cèl·lula.

Els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per la seva pròpia estructura però no tenen la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. Es repliquen envaint una cèl·lula i utilitzant la seva maquinària per expressar el genoma viral. En enginyeria genètica s'utilitzen els virus com a vector, ja que permeten introduir un plàsmid al interior d'una cèl·lula pel propi mecanisme infecció del virus. S'utilitzen virus defectius, és a dir, que no són capaços de replicar-se i produir nous virus, en els quals el genoma viral és substituït pel plàsmid desitjat.

2.2.1 Protocol general pel clonatge d'un insert d'ADN en un plàsmid

Es digereixen tant el plàsmid com l'insert d'ADN amb els enzims de restricció corresponents, excepte en el cas del clonatge de shRNAi en el plàsmid pSUPER, on l'insert ja presenta les dianes corresponents (veure apartat 2.2.2.1).

Tant l'insert digerit com el plàsmid digerit s'han de netejar de sals, enzims de restricció i/o dels fragments d'ADN no necessari per la qual cosa s'utilitzen kits comercials (Qiagen) de purificació d'ADN a partir de gels d'agarosa. La reacció de lligació es realitza en proporció molar de 1:3 de plàsmid respecte l'insert, utilitzant l'enzim T4 Lligasa (Roche), i es transforma en la soca bacteriana *E. coli* DH5 α . La transformació dels bacteris competents es realitza per un protocol de xoc tèrmic. Tant la soca bacteriana original com els bacteris ja transformats pels diferents plàsmids utilitzats es conserven congelats a -80°C amb un 20% de glicerol.

Un cop transformada la lligació dins la soca bacteriana cal escollir aquelles colònies que han internalitzat el plàsmid amb l'insert i descartar aquelles que han internalitzat plàsmid buit. Per fer-ho hem posat apunt una nova tècnica que ens estalvia de fer créixer cada clon, extreure'n ADN i digerir-lo. A partir de la placa amb els bacteris transformats piquem varies colònies amb una punta de pipeta estèril, i "toquem" 5 μ l d'aigua estèril de PCR amb la punta abans de posar els bacteris a créixer. Es realitza una reacció de PCR utilitzant oligonucleòtids damunt el plàsmid flanquejant el punt de inserció, en el clonatge dels shRNAi s'obté un fragment de 200pb si el plàsmid està buit o de 250pb si s'ha inserit l'insert (**Fig. 25**).

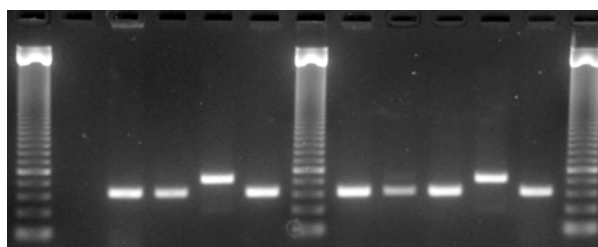


Figura 25. Exemple de comprovació de colònies positives per PCR directe de colònia durant el clonatge d'alguns shRNAi. Marcador de pesos moleculars de 50pb, la banda més intensa correspon a 250pb. Les colònies positives presenten un producte de PCR d'aprox. 220pb, mentre que les negatives de només 160pb.

2.2.2 Clonatge de les construccions de shRNAi

La interferència d'ARN (shRNAi, *short RNA interference*) indueix la degradació d'un ARN missatger determinat mitjançant l'utilització de siRNA (*small interfering RNA*) (Fire et al., 1998), que són fragments d'ARN d'entre 22 i 25

Materials i Mètodes

nucleòtids derivats de la fragmentació d'ARN lineal de doble cadena, que s'uneixen a seqüències d'ARN homòlogues induint la seva degradació (Nelson et al., 2003).

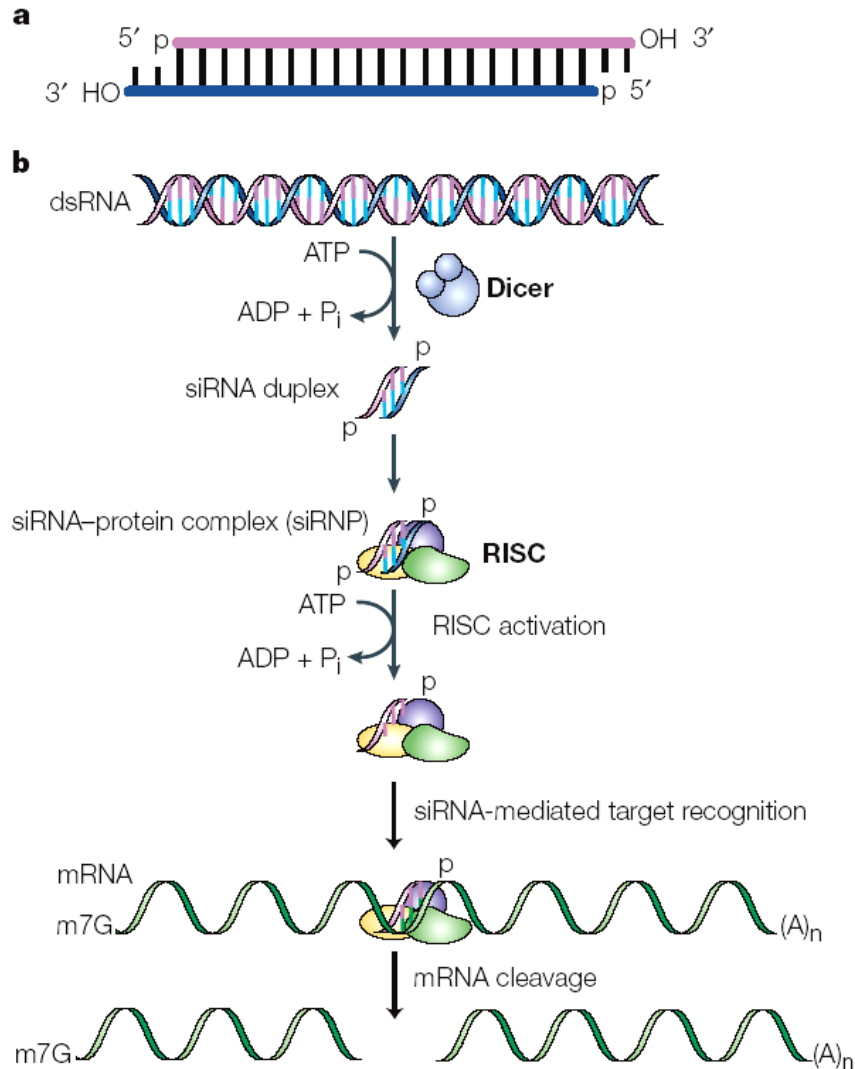


Figura 26. Vies de interferència d'ARN. A) *Small interfering RNA* (siRNA). La molècula estàndard de siRNA inclou extrems 5' fosforil·lats, un regió de doble cadena de 19 nucleòtids i dos nucleòtids desaparellats i defosforil·lats als extrems 3', i que són característics dels productes de tall de la RNAsa III (Dornburg and Pomerantz, 2000). B) Via dels siRNA. Un membre de la família de RNAsa III, Dicer, talla de forma dependent d'ATP les cadenes llargues d'ARN de doble cadena formant els shRNAi (Novina et al., 2002). Aquests siRNA s'incorporen dins del complex inductor del silenciament d'ARN (RISC, RNA-inducing silencing complex). Tot i que l'entrada a RISC dels shRNAi és independent d'ATP, la relaxació del duplex de siRNA necessita d'ATP. Un cop relaxat, la cadena simple anti-sense guia a RISC cap a l'ARNm que és complementari a la seqüència i es dona el tall endonucleolític de la cadena de ARNm. Adaptat de (Dykxhoorn et al., 2003)

La tècnica de la interferència d'ARN (veure **figura 26** per al mecanisme de funcionament) s'utilitza per a silenciar l'expressió gènica d'una seqüència específica, la qual cosa permet dur a terme anàlisis sistemàtics de l'expressió gènica i existeix la possibilitat que pugui ser utilitzat com a teràpia gènica per a silenciar gens (Dykxhoorn et al., 2003).

2.2.2.1 Subclonatge dels shRNAi en el vector pSUPER.Retro.Puro

El sistema basat en el plàsmid pSUPER.retro.puro (OligoEngine) provoca una disminució de l'expressió d'un gen diana de forma eficient i específica. És un vector d'expressió en mamífers que dirigeix la síntesi de transcrits de siRNA sota el promotor de la polimerasa III. L'estratègia del subclonatge es basa en trobar una seqüència adient de 19 o 21 nucleòtids que pertanyi al gen diana (mitjançant diferents programes bioinformàtics accessibles per internet) amb la que es dissenyen els dos oligonucleòtids, Fwd (*Forward*) i Rev (*Reverse*) seguint les instruccions detallades pel proveïdor del plàsmid en www.oligoengine.com (Taula 1).

L'anellament dels primers es realitza en 50 mM Hepes pH 7,4 amb 100 mM NaCl utilitzant una concentració de cada primer 3 µg/µl. El protocol d'anellament dels primers va disminuint progressivament la temperatura de 94°C a 10°C, augmentant el temps de incubació en cada temperatura tal com es mostra en la **Figura 27**. Els primers anellats presenten extrems protuberants, amb les dianes BglII i HindIII ja llestes per al clonatge, es digereix el plàsmid pSUPER per aquestes dianes, i es procedeix al clonatge tal com s'ha descrit en l'apartat 2.2.1.

Temperatura	90°C	70°C	60°C	50°C	37°C	10°C
Temps	4 min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min

Figura 27. Protocol d'anellament dels oligonucleòtids per a shRNAi.

2.2.2.2 Subclonatge dels shRNAi en el vector lentiviral pLVTHM

El vector lentiviral pLVTHM, cedit pel Dr. Trono (Trono, 2000) ha estat especialment dissenyat per a facilitar la inserció del siRNA subclonat en pSUPER.retro.puro dins del vector lentiviral (Naldini et al., 1996). El fragment del promotor H1 reconegut per la polimerasa III que conté el vector pLVTHM pot ser

Materials i Mètodes

reemplaçat pel fragment “H1-siRNA” del plàsmid pSUPER utilitzant les dianes de clonatge EcoRI – ClaI. Així doncs, hem obtingut les mateixes construccions siRNA (**Taula 1**) en el vector lentiviral per a poder utilitzar la tècnica de la interferència d’ARN per infeccions lentivirals en cultius primaris (veure apartat 1.5.4).

Gen	Seqüència dels oligonucleòtids (5' → 3')
EndoG	gatccccGGAACAACCTTGAGAAGTAttcaagagaTACTTCTCAAGGTTGTTCCttttta agcttaaaaaGGAACAACCTTGAGAAGTAtctcttgaaTACTTCTCAAGGTTGTTCCggg
AIF	gatccccGGCAACATGGTGAAACTTAttcaagagaTAAGTTTCACCATGTTGCCttttta agcttaaaaaGGCAACATGGTGAAACTTA tctcttgaaTAAGTTTCACCATGTTGCCggg
Scrambled	gatccccGAATGCTAAGATGTCTAATtcaagagaATTAGACATCTTAGCATTCTttttta agcttaaaaaGAATGCTAAGATGTCTAATtctcttgaaATTAGACATCTTAGCATTCTggg
DNAsa I	gatccccGGATACTAAGATGTCTAATtcaagagaATTAGACATCTTAGTATCCttttta agcttaaaaaGGATACTAAGATGTCTAATtctcttgaaATTAGACATCTTAGTATCCggg
DNAsa II	gatccccGAAGGGTCTGATGTATAAAAttcaagagaTTTATACATCAGACCCTTCTttttta agcttaaaaaGAAGGGTCTGATGTATAAAAtctcttgaaTTTATACATCAGACCCTTCTggg
Topo II	gatccccGCTGCTGATACCAAACAAAttcaagagaTTTGTTTGTATCAGCAGCttttta agcttaaaaaGCTGCTGATACCAAACAAAtctcttgaaTTTGTTTGTATCAGCAGCggg
Fen-1	gatccccGCATCAAGCCGGTGTATATtcaagagaATATACACCGGCTTGATGCttttta agcttaaaaaGCATCAAGCCGGTGTATATtctcttgaaATATACACCGGCTTGATGCggg
TatDRn1	gatccccGGGTGTCATCCCATGAGATGTtcaagagaACATCTCATGGGATGACACCCttttta agcttaaaaaGGGTGTCATCCCATGAGATGTtctcttgaaACATCTCATGGGATGACACCCggg
TatDRn2	gatccccGATTGACTTGGACCTTTATtcaagagaATAAAGGTCCAAGTCAATCTttttta agcttaaaaaGATTGACTTGGACCTTTATtctcttgaaATAAAGGTCCAAGTCAATCTggg
TatDHs	gatccccGATTGACTTGGATCTTTATtcaagagaATAAAGATCCAAGTCAATCTttttta agcttaaaaaGATTGACTTGGATCTTTATtctcttgaaATAAAGATCCAAGTCAATCTggg
Exosc5	gatccccGGTGAAGGTCAGCAAAGAAAttcaagagaTTCTTTGCTGACCTTCACCTttttta agcttaaaaaGGTGAAGGTCAGCAAAGAAAtctcttgaaTTCTTTGCTGACCTTCACCTggg
BNIP3	gatccccGATACCAACAGAGCTGAAATAttcaagagaTATTCAGCTCTGTTGGTATCTttttta agcttaaaaaGATACCAACAGAGCTGAAATAtctcttgaaTATTCAGCTCTGTTGGTATCTggg
Nix	gatccccGAAGACGGGCAAATAATGTtcaagagaACATTATTTGCCCGTCTTCTttttta agcttaaaaaGAAGACGGGCAAATAATGTtctcttgaaACATTATTTGCCCGTCTTCTggg

Taula 1. Seqüència de 19 o 21 nucleòtids escollida per a l’ARN d’interferència dels gens d’estudi. S’han realitzat 2 shRNAi per a TatD de rata (TatDRn1 i TatDRn2) i un per a la seqüència humana (TatDHs).

2.2.3 Clonatge de la construcció de EndoG-FLAG

2.2.3.1 Subclonatge en el plàsmid pcDNA3-FLAG 3'

El gen d'endonucleasa G l'hem obtingut del consorci sense ànim de lucre *I.M.A.G.E.*, clon 5029633 en el vector pcCMV-SPORT6. Utilitzant dues seqüències d'oligonucleòtids que introdueixen les dianes EcoRI i ClaI en 5' i 3' respectivament s'ha amplificat el gen d'endonucleasa G per PCR i s'ha clonat en el plàsmid pcDNA3-FLAG3', que introdueix la seqüència de FLAG (**Fig. 28**) en posició 3' d'EndoG. Per a què la construcció sigui funcional l'oligonucleòtid en 3' ha introduït una mutació en el codó stop (TGA) del gen.

G	A	C	T	A	C	A	A	G	A	C	G	A	C	G	A	A	G
D	Y	K	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	K

Figura 28. Codons codificants per la seqüència d'aminoàcids FLAG.

Per a la PCR d'amplificació d'endonucleasa G a partir del clon IMAGE s'ha tingut en compte les diferències en la temperatura d'anellament dels primers en els diferents cicles. En els primers cicles de la PCR només s'anellen a l'ADN motlle els nucleòtids equivalents a la seqüència, però no els de les dianes de restricció. A mesura que el nombre de cicles augmenta, augmenta exponencialment en nombre de molècules ja amplificades, que inclouen les dianes de restricció a les quals es pot anellar l'oligonucleòtid sencer. Així doncs, els primers 7 cicles consten de 30 segons de desnaturalització a 95°C, 30 segons d'anellament a 55°C i 1 minut d'elongació a 72°C; mentre que en els següents 29 cicles s'augmenta la temperatura d'anellament a 60°C i la resta dels paràmetres es mantenen igual.

Un cop obtingut el gen d'endonucleasa G amplificat, es va digerir tant el producte de PCR amplificat com el plàsmid receptor del gen amb els enzims de restricció corresponents i es va realitzar el clonatge tal com hem descrit en l'apartat 2.2.1.

2.2.3.2 Subclonatges de EndoG-FLAG en el vector lentiviral

El vector lentiviral per a sobreexpressió, pEIGW-SK, té una regió de polilinker amb poques dianes de restricció, per la qual cosa cal subclonar el gen

d'interès primer en el vector pCRII-SK, i a continuació passar-lo al vector pEIGW-SK utilitzant generalment les dianes de l'enzim de restricció SfiI, que són equivalents en ambdós plàsmids. Ambdós plàsmids, al igual que els vectors lentivirals per shRNAi, han estat cedits pel Dr. Trono.

2.3 ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER RT-PCR

2.3.1 Comprovació del funcionament dels shRNAi

L'eficàcia dels shRNAi en els cultius transduïts la comprovem a nivell de la repressió de l'ARN missatger (RT-PCR), tot i que seria més adequat fer-ho a nivell de proteïna, degut a què en molts casos no disposem de bons anticossos.

L'extracció d'ARN dels cultius cel·lulars es fa utilitzant el kit comercial *RNAeasy mini kit* (Qiagen) acoblat a digestió amb DNAsa I, que elimina l'ADN genòmic contaminant que pugui restar a la mostra i donar una senyal falsa. Els extractes d'ARN es guarden a -80°C, es verifica que no hi hagi degradació per electroforesi en gel d'agarosa del 2% i es quantifica en l'espectrofotòmetre NanoDrop® ND-1000.

La reacció de transcripció reversa (RT) es realitza segons el protocol de l'enzim retrotranscriptasa de Taqman® (Applied Biosystems) a partir de 1 µg o 4 µg d'ARN. Partint dels mateixos volums de producte RT es realitza la reacció de PCR amb l'enzim Suprathem (GeneCraft Germany) i els primers de la **taula 2**. Generalment es fan 35 cicles de: 30 segons a 94°C per la desnaturalització, 30 segons d'anellament de 55°C i 30 segons d'elongació a 72°C, i es treuen alíquotes de 10 µl als cicles 25, 30 i 35, encara que els cicles poden variar lleugerament en funció del gen d'estudi i de l'eficàcia d'amplificació dels primers seleccionats. Els productes de PCR dels diferents cicles es migren en gels d'agarosa al 3% en TAE 1x tenyits amb SYBR Safe (Invitrogen).

Gen	Seqüència dels oligonucleòtids (5' → 3')
EndoG	Fwd: GACTTCCACGAGGACGATTC Rev: AAGCTGCGGCTGTACTTCTC
unr	Fwd: ATCATCTGACCGGAGGACTG Rev: TGAACGTTCCCTTCCACATC

Gen	Seqüència dels oligonucleòtids (5' → 3')
DNAsa I	Fwd: GAGTGGCTTTCAGGATGAGG Rev: CCCGATTGAGTTCATCCAGT
DNAsa II	Fwd: CTGAGCTGCTATGGGGACTC Rev: GGGAGGTTGGTCGTTGTAGA
Topo II	Fwd: CCCAGCAAATGTGGGTTTAC Rev: CATGCCATTTTCGACCACCT
Fen-1	Fwd: GGCTTGGGCTATTCTCTG Rev: GACGAACAGCAATCAGGAC
TatD Rn	Fwd: TGGAATCAACCTGACAGATCC Rev: CGGTCAAATCAAGTCCACAC
TatD Hs	Fwd: AGGGAGAGCTGTCGAGATTG Rev: TGCAGTCGGTCAAATCAAG
Exosc5	Fwd: TAGAACCACTGCCTCACACG Rev: TTGCTTGTGAGCAAACCTG
BNIP3	Fwd: GAATCTGGACGAAGCAGCTC Rev: AACATTTTCTGGCCGACTTG
NIX	Fwd: CTCGTCTTCCATCCACAATG Rev: TGGGATGTTTTTCGGGTCTAC

Taula 2. Seqüència dels primers utilitzats per a l'anàlisi per rtPCR de l'eficàcia dels shRNAi, de l'expressió gènica durant el desenvolupament i de la selecció de clons positius en el clonatge dels vectors lentivirals.

2.4. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEÏNES

2.4.1 Immunofluorescència

Per a la immunodetecció de proteïnes per fluorescència es planten els cardiomiòcits en plaques de 4 pous (M4) de 2 cm² de diàmetre cadascun, a raó de 120.000, 80.000 o 10.000 cèl·lules per placa per als cardiomiòcits embrionals, neonatals i adults respectivament.

Un cop finalitzat el tractament es renten les plaques en solució de PBS i les fixem amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 15 minuts. En cas que es desitgi detectar proteïnes nuclears com és AIF, la fixació es realitza amb metanol 100%

Materials i Mètodes

durant 5 minuts. A continuació es renten les plaques PBS tres vegades de 10 minuts cadascuna, aspirant suaument i amb compte de no deixar assecar els pouets.

Abans de la incubació amb els anticossos cal incubar durant una hora en solució de bloqueig (PBS amb 2% HS, 2% BSA i 0,1% Tritó X-100). En el procés de bloqueig en realitat es donen dos processos: la permeabilització de les membranes que permetrà l'accés dels anticossos als seus antígens específics (gràcies al Tritó X-100) i el bloqueig dels llocs de unió inespecífics (gràcies al BSA i al HS).

La incubació amb els anticossos es realitza en la mateixa solució de bloqueig, ajudant així a evitar unions inespecífiques dels anticossos. L'anticòs primari (**Taula 3**) s'incuba durant dues hores a temperatura ambient, després de tres rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (**Taula 4**). Aquesta incubació es realitza a les fosques, ja que l'anticòs secundari està marcat amb fluorescència. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts en PBS, que en cas de desitjar tinció nuclear amb Hoechst 33258 s'afegeix a la solució de rentat, i es procedeix a muntar la preparació.

S'aspira el PBS de l'últim rentat, es posa una gota de medi de muntatge, generalment Vectashield (Vector) ja que té un efecte protector de la fluorescència, i es cobreix amb un cobreobjectes rodó. Les plaques M4 es guarden a 4°C a les fosques fins a la seva observació al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus IX70. Es recomanable esperar 24h per a prendre les fotografies, ja que disminueix la fluorescència residual de fons inicial.

Antigen	Dilució	Proveïdor	N. de catàleg	Aplicació
α -actinina	1/500 - 1/5000	SIGMA	A7811	IF - WB
α -actina sarcomèrica	1/10000	SIGMA	A2172	WB
AIF	1/2000 - 1/40000	SIGMA	A7549	IF - WB
Apaf-1	1/4000	ALEXIS	ALX-804-349	WB
Bax	1/5000	Cell Signaling	2772	WB
Bcl2	1/2000	NeoMarkers	MS-598	WB
BclX _L	1/5000	BD	610211	WB

Caspasa 2	1/4000	Alexis	ALX-804-356	WB
Caspasa 3	1/4000	Cell Signaling	9665	WB
Caspasa 3 tallada	1/500 - 1/4000	Cell Signaling	9664S	IF - WB
Caspasa 7	1/4000	MBL	JM-3024-100	WB
Caspasa 8	1/10000	Stressgen	AAP-128	WB
Caspasa 9	1/4000	Cell Signaling	9508	WB
Caspasa 9 tallada	1/2000	Cell Signaling	9506	WB
Caspasa 12	1/2000	SIGMA	C7611	WB
COXIV	1/5000	Molec. Probes	A-21348	WB
Citocrom c	1/500	BD	556432	IF
Citocrom c	1/5000	BD	556433	WB
Endonucleasa G	1/3000	ProSci	PSC-3035	IF - WB
Endonucleasa G	1/3000	Santa Cruz	sc-26924	WB
Endonucleasa G	1/3000	SIGMA	E5654	WB
FLAG	1/500 - 1/4000	SIGMA	F3165	IF - WB
Hsp60	1/500 - 1/4000	BD	H99020	IF - WB
LDH	1/5000	Rockland	100-1173	WB

Taula 3. Anticossos primaris utilitzats en assaigs de immunofluorescència i/o Western Blot.
IF: immunofluorescència. WB: Western Blot.

Antigen	Dilució	Proveïdor	N. de catàleg	Aplicació
Rata IgG-POD-conjugated	1/10000	Jackson IR Lab	112-036-072	WB
Conill IgG-HRP	1/5000	SIGMA	A0545	WB
Ratolí IgG-HRP	1/10000	SIGMA	A9917	WB
Cabra IgG-HRP	1/20000	SIGMA	A5420	WB
Gallina IgY-HRP	1/100000	SIGMA	A 9046	WB

Ratolí IgG AlexaFluor 594	1/500	Molec. Probes	A11005	IF
Ratolí IgG AlexaFluor 488	1/500	Molec. Probes	A11001	IF
Conill IgG AlexaFluor 594	1/500	Molec. Probes	A11012	IF

Taula 4. Anticossos secundaris utilitzats en assaigs de immunofluorescència i/o Western Blot. IF: immunofluorescència. WB: Western Blot.

2.4.2 Assaig de Western Blot

2.4.2.1 Extracció de proteïna total en SDS

Després de cada tractament, les cèl·lules en qüestió es renten en tampó fosfat salí fred (PBS) a pH 7,2 abans de procedir a l'extracció proteica pertinent. L'extracció proteica s'ha de fer de forma ràpida i eficient, per evitar degradacions i que l'extracte representi fidelment l'estat fisiològic de la cèl·lula viva.

S'obté una barreja desnaturalitzada dels components cel·lulars. És un mètode d'extracció eficient perquè trenca les interaccions entre proteïnes i permet l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més, el detergent SDS (sodium docecyl sulfate) desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims, incloses les proteases que podrien danyar l'extracte. El tampó d'extracció és Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) al 2% de SDS (Sigma-Aldrich), i s'afegeix sobre la placa del cultiu, que prèviament ha estat rentada en PBS fred. A continuació es soniquen les mostres per fragmentar l'ADN genòmic i així eliminar la viscositat de la mostra. En aquest punt es poden congelar fins que necessitin ser utilitzades.

2.4.2.2 Extracció de proteïna citosòlica

S'obté un extracte proteic enriquit en proteïnes citosòliques i sense contaminacions de proteïnes mitocondrials. El procediment d'extracció es basa en què el manitol a 4°C (en gel) forma cristalls, que s'inserten a la membrana plasmàtica formant forats, pels quals s'allibera el contingut citosòlic, i la resta de la cèl·lula s'elimina per centrifugació. El tampó d'extracció conté Manitol 220mM, Sacarosa 70mM, Hepes-KOH pH 7,2, KCl 10mM, EGTA 5mM, MgCl₂ 2mM, DTT (1,4-ditiotretol) 1mM, PMSF 1mM, NaF 25mM, β-glicerofosfat 50mM i Ortovanadat 1mM. Utilitzant tampó recent preparat i a temperatura ambient, es resuspèn el pellet de cèl·lules i s'incuben en gel durant 20 minuts. En acabar es centrifuga a 750g, 4°C,

durant 10 minuts, i es recupera el sobrenedant, que està enriquit en citosol. Es guarda el pellet com a control, ja que conté les restes de membranes, mitocondris i nucli. Per eliminar qualsevol eventual resta de mitocondris del citosol, es torna a centrifugar a 10.000g, 4°C, durant 20 minuts, i es recupera el sobrenedant.

2.4.2.3 Extracció de proteïna nuclear

S'obté un extracte proteic enriquit en proteïnes nuclears i sense contaminació de proteïnes mitocondrials ni citosòliques. El tampó citoplasmàtic disgrega les membranes cel·lulars i mitocondrials, deixant els nuclis intactes, a continuació es renten els nuclis en un tampó sense tritó per a eliminar les restes de citosol i mitocondris. Per últim es lisen els nuclis, en un tampó amb alta concentració de sals per tal de separar les proteïnes de l'ADN.

El pellet de cèl·lules rentat en PBS es resuspèn en un tampó citoplasmàtic (Hepes 10mM pH 8, NaCl 50mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM, 0,5% tritó, 1x còctel d'inhibidors de proteases sense EDTA (Complete EDTA-free, Roche)), i s'incuba durant 20 minuts a 4°C. Es centrifuga a 1000g, durant 10 minuts a 4°C, es guarda el sobrenedant com a control de l'extracció i es renta el pellet tres vegades en tampó intermig (Hepes 10mM pH 8, NaCl 50mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM, 1x Complete EDTA-free (Roche)) per tal d'eliminar restes citosòliques i mitocondrials, centrifugant a 3000g durant 5 minuts després de cada rentat. El pellet ja rentat, que conté els nuclis sencers, es resuspèn en tampó nuclear (Hepes 10mM pH 8, NaCl 350mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 2mM, 1x Complete EDTA-free (Roche)), i s'incuba en agitació orbital durant 40 minuts a 4°C, durant aquest temps es trenquen els nuclis i es desnaturalitzen les proteïnes nuclears unides a l'ADN. En acabar l'extracció es centrifuga durant 15 minuts a 4°C a 16000g, i es recupera el sobrenedant, que conté l'extracte nuclear.

2.4.2.4 Quantificació de proteïnes pel mètode de Lowry

La quantificació de proteïnes abans de migrar les mostres en gels SDS-PAGE és necessària per a la posterior interpretació dels resultats. Si les diferents mostres d'un mateix experiment per a la immunodetecció de proteïnes no estan igualment

Materials i Mètodes

carregades al gel, no es podran extreure conclusions, ja que no es sabrà si les diferències són degudes només a la càrrega o als efectes del nostre tractament.

Hem utilitzat el mètode de Lowry per a determinar la quantitat de proteïna en una mostra. La casa Bio-Rad comercialitza els reactius per a la quantificació de Lowry. Breument es col·loquen els punts de la recta patró i les mostres a determinar en pous de una placa de 96 pous, per duplicat. Es barregen els reactius A i S (en proporció 50:1), i s'afegeix la barreja al pou amb les mostres. A continuació s'afegeix el substrat fluorogènic (reactiu B) a cada pou, i es deixa continuar la reacció durant 15 minuts. Passat aquest temps es llegeix la placa a una absorbència de 655nm. La recta patró es fa utilitzant concentracions conegudes de BSA i s'utilitza per a estandarditzar els resultats. Els valors d'absorbència de les mostres s'interpolen a la recta patró per tal de determinar la seva concentració proteica.

Cal tenir en compte que aquest mètode és incompatible amb la presència de DTT a la mostra, per tant si el nostre tampó d'extracció necessita DTT per a la correcta protecció de les proteïnes extretes (per exemple en els extractes citosòlics) el que es fa és extreure la mostra sense DTT, quantificar-la immediatament, i afegir ràpidament DTT per a protegir l'extracte de possibles degradacions.

2.4.2.5 Electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Els gels desnaturalitzants de poliactilamida en presència de SDS s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BISTM, que és una solució al 39% d'actilamida amb un 1% de bis-actilamida (Amresco). La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (SIGMA) com a iniciador de la reacció i persulfat amònic (S₂O₈) al 0,05% com a catalitzador.

Hem utilitzat gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'actilamida diferents. En la part superior o gel apilador és on es carreguen les mostres, té un percentatge d'actilamida baix, del 4%, es prepara en tampó Tris-HCl 125 µM a pH 6,8, i serveix per a portar totes les proteïnes del pouet al mateix temps a l'entrada del gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCl 375 µM a pH 8,8, el seu percentatge d'actilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el

seu pes molecular. Per a proteïnes de pes molecular baix com són citocrom c ($\approx 15\text{kDa}$) i COXIV ($\approx 20\text{kDa}$) s'utilitzen gels al 12% d'acrilamida, per a proteïnes d'elevat pes molecular com Apaf-1s'utilitzen gels al 6% ($\approx 30\text{kDa}$), i per a proteïnes de pes molecular intermig com AIF ($\approx 62\text{kDa}$) s'utilitzen gels al 9% d'acrilamida.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 250mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 720 mM β -mercaptoetanol i blau de bromofenol (SIGMA)), es porten totes a un mateix volum amb tampó de càrrega 1x i es carreguen al gel. En un dels pous es carrega un marcador de pesos moleculars pretenyit (Invitrogen). L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 20 mA en el tampó de migració (25mM Tris, 1,44% glicina, 0,1% SDS) en el sistema Hoefer SE600Ruby (Amersham Biosciences) o el Hoefer SE260 (Amersham Biosciences).

2.4.2.6 Transferència de proteïnes

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec (Hoefer TE70, Amersham Biosciences). S'hidrata la membrana de PVDF (Milipore) submergint-la en metanol 100% durant un minut i seguidament en aigua. Submergim el gel d'agarosa, la membrana hidratada i el paper de transferència (Amersham Biosciences) en el tampó de transferència (48mM Tris, 0,0375% SDS, 39 mM glicina i 20% metanol), durant uns 5 minuts per a què s'equilibri abans de començar la transferència. Es col·loquen 2 papers de transferència sobre el l'ànode, a sobre es posa la membrana de PVDF, a sobre el gel de poliacrilamida, i dos papers de transferència més. Es posa la tapa (càtode) i s'inicia la transferència a un amperatge constant de 0,8 mA per cm^2 de membrana.

2.4.2.7 Immunodetecció de proteïnes

Després de la transferència proteica es renta la membrana en TBS-T (20 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) i es bloqueja en solució de bloqueig (TBS-T al 5% de llet desnatada en pols) durant 1 hora a temperatura ambient. En acabar es fan tres rentats de 15 minuts en TBS-T i s'incuba amb una dilució en TBS-T de l'anticòs primari (Taula 3), amb 0,02% d'Azida sòdica per evitar contaminació bacteriana i així poder-lo reutilitzar. La incubació es sol realitzar durant tota la nit a

Materials i Mètodes

4°C, encara que en casos d'anticossos primaris molt potents (per exemple anti-actina) s'incuba una hora a temperatura ambient.

Es recupera i guarda a 4°C la solució de l'anticòs primari i es fan 3 rentats de 15 minuts de la membrana en TBS-T, i s'incuba amb la dilució de l'anticòs secundari (Taula 4) en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. En acabar es renta la membrana tres vegades en TBS-T.

L'anticòs secundari està conjugat a peroxidasa, i per a detectar-la utilitzem uns reactius comercials que associen la catàlisi de l'aigua oxigenada a l'oxidació del luminol, donant lloc a un increment en la quimioluminiscència. Els reactius utilitzats per a revelar la senyal són EZ-ECL (Biological Industries) i Super Signal West Dura (Pierce), que utilitzem respectivament si tenim molta o poca senyal quimioluminiscent. Exposem la senyal luminiscent sobre pel·lícules fotosensibles Fuji super RX, i utilitzem el revelador Kodak HC110 i el fixador Kodak Tmax.

2.4.2.8 Tinció de gels de SDS-PAGE i de membranes de PVDF

Tinció de gels amb Blau de coomassie: El colorant *Coomassie brilliant blue* R-250 (Fluka, Sigma) s'uneix a gairebé totes les proteïnes, tant en condicions desnaturalitzants com no desnaturalitzants. Es pot utilitzar després de l'electroforesi, però nosaltres l'utilitzem en el gel un cop transferit, marcant les proteïnes remanents al gel d'acrilamida, com a control de càrrega del Western Blot. S'utilitza la solució de tinció durant 30 minuts (0,1% Coomassie brilliant blue R-250, 25% isopropanol, 10% àcid acètic), que deixa tot el gel blau. I a continuació es destenyeix en solució decolorant (10% isopropanol, 10% àcid acètic), que s'ha d'anar canviant fins que el gel es veu transparent amb les bandes proteiques de color blau.

Tinció amb Ponceau S: Després de la transferència de proteïnes, per a comprovar que la transferència s'ha donat correctament, es pot tenyir la membrana amb la una solució vermella 0,1% (p/v) del colorant Ponceau S (SIGMA) en 5% àcid acètic durant 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament es renta la membrana en TBS-T i s'aprecien les bandes de proteïnes transferides. És una tinció reversible, així que rentant varies vegades la membrana amb TBS-T la coloració desapareix i es pot seguir amb el bloqueig. Al ser una coloració reversible es poc indicada com a control de càrrega.