

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Caracterización de la interacción entre las proteínas XIAP y FAF1 y su implicación en las vías de apoptosis y del factor nuclear kappaB (NF-kappaB)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marcos Javier Caballero López

Director
Rodrigo Martínez Maza

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE
LAS PROTEÍNAS XIAP Y FAF1 Y SU IMPLICACIÓN EN
LAS VÍAS DE APOPTOSIS Y DEL FACTOR NUCLEAR κ B
(NF- κ B)**

**Tesis doctoral
Marcos Javier Caballero López
Madrid, Noviembre 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE
LAS PROTEÍNAS XIAP Y FAF1 Y SU IMPLICACIÓN EN
LAS VÍAS DE APOPTOSIS Y DEL FACTOR NUCLEAR κ B
(NF- κ B)**

Memoria presentada por
MARCOS JAVIER CABALLERO LÓPEZ
para optar al grado de
DOCTOR EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VºBº del director de esta Tesis:
Dr. Rodrigo Martínez Maza
Grupo de Neuroprotección Molecular. Unidad de Neurología Experimental
(Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo)



Don **Rodrigo Martínez Maza**, Doctor en Ciencias (Bioquímica y Biología Molecular) e Investigador principal del Grupo de Neuroprotección Molecular (GNPM), perteneciente a la Unidad de neurología experimental del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS XIAP Y FAF1 Y SU IMPLICACIÓN EN LAS VÍAS DE APOPTOSIS Y DEL FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B)**”, presentado por Don Marcos Javier Caballero López, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su supervisión en el laboratorio de Neuroprotección Molecular del Hospital Nacional de Paraplégicos en Toledo, y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios para ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Toledo, a 26 de Octubre de 2015.

Fdo: Dr Rodrigo Martínez Maza

A mis padres y a mi hermana.

Os quiero.

“What would you attempt to do if you knew you could not fail?”
–Taza del laboratorio-

Agradecimientos

Tras varios meses escribiendo, revisando, reescribiendo, revisando, reestructurando,... por fin un apartado que no necesita pasar tanto proceso. ¡Por fin termino! Ha sido un camino largo y en muchas ocasiones amargo el que he recorrido para completar este manuscrito, y desde luego que de ninguna manera lo hubiera podido hacer sin la ayuda y apoyo de bastante gente que ha estado presente a lo largo de toda, o parte, de esta andadura.

Sin lugar a dudas voy a empezar con Rodrigo, una de las personas con la que me entrevisté cuando llegué al Hospital de Paraplégicos deseoso de encontrar un laboratorio donde pasar los siguientes años formándome para ser un buen investigador. Rodrigo supo transmitirme lo que necesitaba sentir para emocionarme y querer formar parte del Grupo de Neuroprotección Molecular (GNPM). Entonces vinieron los primeros años de esfuerzo, aprendiendo montones de técnicas, pasando horas y horas en el animalario donde vivíamos una especie de “Gran Hermano” particular pasando tanto tiempo encerrados, compartiendo vivencias, secretos y otras cuestiones personales. La verdad es que guardo muy buenos recuerdos de aquella época. Quiero recordar y dar las gracias a Carmen, compañera de aquellos primeros años, y que tanto me inspiro con su alegría y esfuerzo diario. Te mando un gran abrazo hasta el otro lado del mundo.

El tiempo fue pasando y como ocurre en ciencia, las cosas no salen a la primera, los experimentos empiezan a no salir, los resultados sin sentido me rodean, cambio de condiciones, de técnica, de células,... y vuelta a empezar, el tiempo pasa y cuando parecía que todo se iba encauzando, la alegría por conseguir una beca para financiar la finalización de la Tesis se hunde cuando un año después de concedida, se anula. Cosas de la crisis. En este último año, era hora de ponerse en serio con la Tesis dejando de lado otras actividades y trabajos. Durante todo este periplo, agradezco el apoyo de mis compañeros de laboratorio, David y Teresa, que se han ofrecido y han estado para todo lo que he necesitado, siempre con una sonrisa y dispuestos a aparcar su trabajo para ayudarme con lo que sea. Irene, que en poco tiempo se ha hecho un gran hueco en este laboratorio y también me ha acompañado con su sonrisa y apoyo. Las risas con todo el grupo durante la comida no han tenido desperdicio, incluyendo aprendices célebres que también han pasado por aquí este año y han dejado su estela como “Carlos Alfredo, er

morenillo shiquitillo de la voz kí”, María que habla de cuchillos, Ágata y su mundo,... con todos ellos he reído al son del doctor karamba, la citas de armario, los filtros para poder hablar,... no hay mejor terapia para seguir trabajando que unas buenas carcajadas. Pero he de decir que soy más búho que alondra, y gran parte de la escritura la he desarrollado en esas largas tardes... acompañado de Ángela y Manolo. Con ellos he compartido más que tiempo, sintiendo su cercanía y apoyándonos mutuamente durante esos descansos en los que todas las preocupaciones parecían disolverse en el tiempo en el que se fuma un cigarrillo. Y lo mismo descubres un nuevo punto de vista de tus resultados, una nueva estadística que marca la diferencia, o te enfrascas en una discusión sobre la sexualidad y costumbres sociales de los orcos la Tierra Media. Ángela, tú si que vales, “por encima de tí ya no hay nada” :) . Y ya para terminar voy a hacer una mención especial a Manolo, que me aguantó las últimas semanas sin descanso para que este trabajo se terminara a tiempo, y solo a cambio de unas “chucherías”. Muchas gracias a todos, de verdad. GRACIAS.

Fuera de mi laboratorio también he tenido gente que ha influido científicamente durante estos años, y aquí voy a nombrar a Enredate, ese grupo de gente mayoritariamente compañeros del hospital de los que he absorbido su pasión y diversidad de opiniones sobre la ciencia y la vida. Sobre todo gracias a Eider, con quien he compartido muchas cosas dentro y fuera de la ciencia y siempre he encontrado un remanso de paz dando un paseo o tomando una cerveza juntos. Hobeto, zurekin egotea gaitik. Es una suerte tenerte cerca. Muchas otras personas se han cruzado en mi camino durante todo este tiempo, y tengo que agradecer a casi todas sus ánimos, palabras de apoyo, e interés por que finalizase esta Tesis. Gente que he conocido en Pueblo Inglés, en mi vida de bailarín, o en otros entornos... con muchos de ellos he tenido largas charlas, he recibido buenos consejos y lo he agradecido mucho. A todos ellos muchas gracias.

Y voy a dejar a las 3 personas que más me han apoyado durante todo este tiempo hasta el final. Marta y Rafa, mis dos grandes amigos que por mas tiempo que pase seguiremos queriéndonos y apoyándonos para lo bueno y para lo malo, ellos han aguantado mis malos momentos y han reído a mi lado en los buenos, y cuando no quería ver o hablar con nadie, siempre he encontrado cobijo en sus palabras. Muchas gracias. ¿Quién me queda? Alguien muy especial, por supuesto Asun, un Sol que un buen día

apareció en mi vida con intención de quedarse. Desde el primer momento nos llevamos a las mil maravillas, y así seguirá siendo. Casi empezamos juntos en esta andadura de la Tesis y casi lo hemos terminado juntos. Su constante sonrisa, alegría, buen humor y cariño nunca han cesado durante estos años, cada momento que hemos pasado juntos lo atesoro con intensidad, y me siento muy afortunado por tenerte como amiga. Gracias por formar parte de mi vida.

Y para terminar voy a agradecer a mi familia su eterna paciencia conmigo, y su amor incondicional. Siempre al pie del cañon para echarme una mano en cualquier momento. No podría haber tenido mejor respaldo que vuestra disposición y comprensión, adivinando que puedo necesitar antes de que yo mismo lo sepa, me habéis facilitado mucho el camino y por fin he terminado esta fase de mi vida. Muchas gracias por todo.

Va por vosotros.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	21
2. RESUMEN-SUMMARY.....	29
3. INTRODUCCIÓN.....	39
3.1 Muerte celular.....	39
3.2 Apoptosis.....	43
3.2.1 Descubrimiento y características morfológicas.....	43
3.2.2 Características bioquímicas y vías de señalización.....	46
3.2.3 La apoptosis en condiciones fisiológicas y patológicas.....	51
3.3 La vía extrínseca y los receptores de muerte celular.....	53
3.3.1 La vía de muerte mediada por el receptor CD95/Fas.....	54
3.3.2 Las vías de muerte y supervivencia mediadas por el receptor TNFR1.....	59
3.4 La proteína anti-apoptótica XIAP.....	63
3.4.1 Función.....	66
3.4.1.1 Muerte celular.....	66
3.4.1.2 Supervivencia.....	67
3.4.1.3 Otras interacciones.....	68
3.4.2 Regulación.....	69
3.5 La proteína reguladora FAF1.....	74
3.5.1 Estructura y función.....	75
4. OBJETIVOS.....	85
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
5.1 Reactivos generales.....	91
5.2 Anticuerpos.....	92
5.3 Cultivos celulares y preparación de muestras.....	92
5.3.1 Líneas celulares.....	92
5.3.2 Obtención de extractos celulares.....	94

5.3.3	Plásmidos y vectores de expresión.....	95
5.3.4	Método de transfección.....	98
5.4	Ensayo de interacción XIAP-FAF1 en levaduras.....	99
5.5	Análisis de proteínas mediante <i>western-blot</i>	101
5.5.1	Medición de concentración de extractos celulares	101
5.5.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	101
5.5.3	Inmunomarcaje de proteínas (<i>western-blot</i>).....	102
5.5.4	Ensayo de procesamiento de caspasas.....	103
5.6	Ensayo GST <i>pull-down</i>	103
5.7	Inmunoprecipitación.....	104
5.8	Ensayo de ubiquitinación.	104
5.9	Ensayo de actividad del Factor Nuclear κ B	105
5.10	Ensayo de actividad bioquímica de caspasas.....	106
5.11	Ensayo de inmunocitoquímica.....	106
5.12	Ensayo de viabilidad por morfología celular.....	109
5.13	Estudio de viabilidad y análisis morfológico automatizado.....	110
5.14	Citometría de flujo.....	111
5.15	Análisis estadístico.....	112
6.	RESULTADOS	117
6.1.	Verificación de la interacción entre XIAP y FAF1.....	117
6.2.	Análisis de la región de interacción entre XIAP y FAF1.....	121
6.3.	Localización subcelular de XIAP y FAF1	125
6.4.	Degradación de FAF1 mediada por XIAP.....	132
6.5.	Papel de la interacción XIAP-FAF1 en la muerte celular.....	134
6.5.1	Estudio de la activación de caspasas en el proceso apoptótico.....	145
6.5.2	Localización celular de las proteínas FAF1 y XIAP durante el proceso apoptótico.....	151
6.6.	Modulación de la vía NF- κ B por la interacción XIAP-FAF1.....	158
6.6.1	Modulación de FAF1 sobre la actividad de XIAP en la vía NF- κ B.....	162
6.6.2	Modulación de XIAP sobre la actividad de FAF1 en la vía NF- κ B.....	165

7. DISCUSIÓN.....	171.
7.1 Validación de la interacción XIAP-FAF1.....	171
7.2 . Distribución intracelular e interacción XIAP-FAF1.....	173
7.3 Regiones mínimas de interacción entre XIAP y FAF1.....	175
7.4 XIAP ubiquitina a FAF1.....	179
7.5 Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP en la citoprotección mediada por XIAP.....	180
7.6 Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la muerte mediada por FAF1 y la activación de la vía de Fas/CD95.....	184
7.7 Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la activación de la vía NF- κ B inducida por XIAP.....	189
7.8 Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la inhibición de la vía NF- κ B inducida por FAF1.....	191
8. CONCLUSIONES.....	203
9. BIBLIOGRAFÍA.....	206

ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
3AT	<i>3-Amino-1,2,4-triazole</i>
AD	<i>Action domain</i>
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ARTS	<i>Apoptosis-related protein in the TGF-β signaling pathway</i>
aSMase	<i>Acid sphingomyelinases</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BD	<i>Binding domain</i>
BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein.</i>
BSA	<i>Bovin serum albumin</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domains</i>
CCS	<i>Copper chaperone for SOD</i>
CCS	<i>Copper chaperone for superoxide dismutase</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95 (CD95)</i>
cFLIP	<i>Cellular FLICE inhibitory protein</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
COMMD1	<i>Copper metabolism (Murr1) domain containing 1</i>
CRD	<i>Cysteine rich domain</i>
CTSD	<i>Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)</i>
CYLD	<i>Cylindromatosis</i>
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>

DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DOC	<i>Desoxicolic acid</i>
dominio IBM	<i>IAPs binding motiv</i>
DR	<i>Death receptor</i>
DTT	<i>Ditiotreititol</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMEM	<i>Eagle's medium containing Earle's salts</i>
ERK1 / MAPK3	<i>Eextracellular-signal-regulated kinases / Mitogen-activated protein kinase 3</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with death domain</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FLICE/Caspase-8	<i>FADD-like IL-1beta-converting enzyme</i>
FLIP	<i>C-FLICE inhibitory protein</i>
GSPT1	<i>G1 to S phase transition protein</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HAX-1	<i>HS1-associated protein XI</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IκBα	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LB	<i>Lysogeny broth (Medio de crecimiento para bacterias)</i>

LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
Mdm2	<i>Murine doble minute 2</i>
MEKK2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2</i>
MEKK3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
MMP	<i>Mitochondrial membrane permeabilization</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outhar membrane permeabilization</i>
MOPS	<i>4-morpholinepropanesulfonic acid</i>
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NCCD	<i>Nommenclature Committee on Cell Death</i>
Nec-1	<i>Necrostatin-1</i>
NEM	<i>N-Etilmaleimida</i>
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIK	<i>NF-kappa-B-inducing kinase</i>
NK	<i>Natural killers</i>
NLR	<i>NOD-like Receptors</i>
NP-40	<i>Nonyl phenoxyethoxyethanol</i>
NRAGE	<i>Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue</i>
nSMase	<i>Neutral sphingomyelinase</i>
ONPG	<i>Orto-nitrofenil-b-galactosido</i>
p75NTR	<i>P75 neurotrophin receptor</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PS	<i>Phosphatidyl serine</i>
PVDF	<i>Polifluoruro de vinileno</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RIP1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SD	<i>Synthetic dextrose</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SODD	<i>Silencer of death domains protein</i>
TAB1	<i>TAK1 activating binding protein</i>
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane, THAM</i>
XAF1	<i>XIAP-associated factor 1</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
zVAD-fmk	<i>Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone</i>

RESUMEN / SUMMARY

2. RESUMEN/SUMMARY

Caracterización de la interacción entre las proteínas XIAP y FAF1 y su implicación en las vías de apoptosis y del factor nuclear κ B (NF- κ B)

La apoptosis es uno de los procesos de muerte celular programada que está estrechamente regulado por el equilibrio entre estímulos nocivos y citoprotectores. Entre los componentes celulares implicados en la citoprotección destaca la proteína XIAP, perteneciente a la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis, IAPs, y único miembro capaz de bloquear directamente a las caspasas efectoras 3 y 7 y a la caspasa iniciadora 9, interrumpiendo la muerte celular dependiente de caspasas. Además, XIAP promueve la expresión de genes de supervivencia mediante la inducción de la vía NF- κ B. La alteración de la actividad de XIAP está relacionada con numerosas patologías asociadas a la muerte celular programada por lo que el estudio de la modulación de XIAP permitirá comprender su papel en apoptosis y permitirá identificar posibles dianas terapéuticas para su tratamiento. En la búsqueda de nuevos reguladores que controlen su función hallamos la proteína, pro-apoptótica FAF1 que forma parte del complejo inductor de muerte celular, DISC, que interacciona tanto con el receptor Fas/CD95, como con la caspasa 8 y la proteína adaptadora FADD. Además de su función en la vía apoptótica, también es capaz de inhibir la vía prosupervivencia NF- κ B.

Atendiendo al papel que cumplen ambas proteínas tanto en las vías de apoptosis como de NF- κ B hipotetizamos que ambas proteínas interactúan y que esta interacción modula su actividad en estas vías. En primer lugar nuestro objetivo ha sido verificar la interacción entre XIAP y la proteína FAF1, caracterizando las regiones mínimas de esta interacción y estudiando la localización subcelular de ambas proteínas, comprobando su colocalización. Posteriormente, establecimos como objetivos: estudiar la actividad enzimática (E3 ubiquitín ligasa) de XIAP sobre FAF1; determinar el efecto de la interacción FAF1-XIAP sobre la vía apoptótica extrínseca; y evaluar la implicación funcional de la interacción FAF1-XIAP en la vía de señalización NF- κ B.

Hemos corroborado la interacción entre XIAP y FAF1 en células eucariotas mediante inmunoprecipitación de las proteínas endógenas y utilizando mutantes de delección observamos que la interacción se produce entre los dominios BIR de la proteína XIAP y la región Nt del dominio DEDID de FAF1. Mediante microscopía confocal hemos determinado la colocalización de ambas proteínas en el citoplasma y núcleo, empleando diferentes índices de solapamiento (Pearson, Malders, M1/M2 y k1/k2).

Nuestros resultados de inmunoprecipitación demuestran que XIAP incorpora la molécula ubiquitina a FAF1 mediante su dominio RING, marcándolo para degradación proteosomal. Posteriormente, evaluamos la citoprotección de XIAP en presencia de FAF1 sin y con estímulos nocivos mediante el sistema robotizado de análisis celular InCell, citometría de flujo y valoración de morfología nuclear. Concluyendo que FAF1 no es capaz de alterar en ningún caso el efecto citoprotector de XIAP. Por su parte, XIAP durante el proceso apoptótico inducido por FAF1, disminuye el procesamiento proteolítico de las caspasas 3, 7 y 9, y la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7. Además, hemos descrito que la sobreexpresión de XIAP disminuye la actividad de la caspasa 8, mediante su interacción con FAF1. La proteína XIAP es un activador de la vía de supervivencia del factor nuclear κ B (NF- κ B) a través del complejo XIAP-TAB1-TAK1, que activa el complejo de IKKs. A su vez, FAF1 inhibe la vía, desestabilizando los complejos IKKs y secuestrando el factor de transcripción p65 en el citoplasma, evitando su entrada al núcleo. Hemos comprobado mediante estudios de luminiscencia que la proteína FAF1 no interfiere en la unión de XIAP con TAB1, necesaria para su activación de la vía NF- κ B. Por su parte, XIAP es capaz de atenuar la inhibición vía NF- κ B debida a FAF1, mediante la interacción directa de sus dominios BIR, además de mediante su degradación mediada por la unión de ubiquitinas.

En conjunto, esta tesis doctoral describe por primera vez la interacción entre FAF1 y XIAP. La proteína FAF1 no altera la capacidad citoprotectora de XIAP si bien, XIAP interfiere en la actividad pro-apoptótica de FAF1 bloqueando las vías caspasa-dependientes. Igualmente, FAF1 no modula la activación de la vía NF- κ B inducida por XIAP en tanto que XIAP regula la inhibición de FAF1 por la interacción directa y por el marcaje con ubiquitinas para su degradación por el proteosoma.

Puesto que ambas proteínas se encuentran estrechamente relacionadas en distintas patologías, el mejor conocimiento del equilibrio de estos dos factores ayudará en la búsqueda de nuevas terapias.

Palabras clave: FAF1, XIAP, Apoptosis, NF- κ B.

Characterization of the XIAP and FAF1 proteins interaction and implications on apoptosis and nuclear factor κ B (NF- κ B) pathways.

Programmed cell death apoptosis is a process tightly regulated cell by the balance between deleterious and protective signals. The XIAP (X-linked chromosome IAP), a protein belonging to the Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) family, directly binds to and inhibits the upstream caspase 9, and downstream caspases 3 and 7 to prevent cell death. Besides preventing caspase-dependent cell death, XIAP also activate the NF- κ B survival pathway. The disruption of XIAP expression levels is related to numerous pathologies involving disordered programmed cell death. Therefore, understanding the role of XIAP in apoptosis and its regulation by other factors will allow us to identify possible therapeutic targets for future treatments. Searching for new XIAP regulators, we found the FAF1 protein (Fas Associated Factor 1). FAF1 is a pro-apoptotic protein, which is part of the cell death complex DISC (Death Inducing Signalling Complex) interacting with Fas/CD95 death receptor, the adaptor protein FADD and the initiator caspase 8 and induces cell death. FAF1 is also able to hinder the activation of NF- κ B survival pathway.

Considering the role of these proteins in apoptotic and NF- κ B pathways, we hypothesize that XIAP and FAF1 interact and that this interaction regulates their actions in these signalling pathways. Our main goal was to verify the XIAP-FAF1 interaction in order to establish the minimal interaction area of the interface and to determine the subcellular localization of both proteins. We approach the functional role of XIAP-FAF1 interactions studying the XIAP enzymatic activity (E3 ubiquitin ligase) on FAF1; determining the effect of the XIAP-FAF1 interaction on the extrinsic apoptotic pathway; and assessing the functional implication of the XIAP-FAF1 interaction on the NF- κ B survival pathway.

In our work, we have first confirmed the endogenous XIAP-FAF1 interaction in eukaryotic cells by immunoprecipitation. We generated XIAP and FAF1 truncated mutants and we determined that this interaction occurs between the N-terminal region of XIAP, which spans between BIR1 and BIR3 domains and the N-terminal region of the DEDID domain of FAF1. Using confocal microscopy techniques, we showed that

both proteins have cytoplasmic and nuclear colocalization, calculating several overlapping indexes (Pearson, Manders, M1/M2, k1/k2). We observed that XIAP downregulates FAF1 cellular expression. Our immunoprecipitation experiments have shown the ubiquitination and proteosomal degradation of FAF1, involving XIAP's RING domain. In later experiments, using an InCell analyzer, flow cytometry and nuclear morphology analysis, we observed that XIAP blocks FAF1-induced cell death. FAF1 is not able to interfere with the pro-survival activity of XIAP despite of binding BIR domains of XIAP. To shed light on XIAP and FAF1 cross-talk on apoptosis, we explored the apoptotic caspase-dependent signalling pathway. FAF1 induced cell death is blocked because caspase 3, 7 and 9 cleavage and activity is hindered by XIAP. Besides, XIAP overexpression decreases caspase 8 activity by interacting with FAF1. Because both proteins inversely regulate the NF- κ B pathway, we studied their influence on this signalling pathway when co-expressed. XIAP activates NF- κ B pathway through the formation of XIAP-TAB1-TAK1 complex, which, in turn, activates IKK complex. Conversely, FAF1 inhibits NF- κ B activation by disrupting IKK complex and preventing p65 enters the nucleus. Our experiments with luminescence activity reveal that FAF1 does not interfere with the TAB1-XIAP interaction, but is able to reduce NF- κ B activation by XIAP because of the direct effects on the pathway. However, XIAP is able to interfere with the ability of FAF1 to downregulate NF- κ B signalling by either interaction of BIR domains or promoting FAF1 ubiquitination and degradation.

This thesis describes a novel interaction between XIAP and FAF1 and show the existence of new cellular mechanisms through which these two proteins regulate apoptotic and non-apoptotic processes. Given that both proteins are closely involved in different diseases, a better understanding of the balance and effects of the XIAP-FAF1 interaction will help in the search for promising therapies.

Key words: FAF1, XIAP, Apoptosis, NF- κ B

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1 MUERTE CELULAR

Según establece la teoría celular, la célula es la unidad más pequeña de vida, caracterizada por la capacidad metabólica, de replicación y de reacción a estímulos. Por contraposición, la muerte celular puede definirse como la pérdida de estas funciones. Sin embargo, la determinación y definición precisa del evento de muerte celular resulta complejo dado que la pérdida de las funciones y la desaparición de la propia célula ocurre a través de un proceso que se extiende en el tiempo. De acuerdo con las definiciones del campo de la Patología Celular, la muerte celular se puede considerar como el punto de no retorno en este proceso, a partir del cual no puede detenerse el proceso degenerativo de la célula (figura II) (Majno, La Gattuta et al. 1960; Trump, Goldblatt et al. 1965; Ginn, Hochstein et al. 1969). La identificación de este punto sin retorno no resulta clara, habiéndose planteado clásicamente eventos como la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria o la exposición en el exterior de la membrana plasmática de moléculas como la fosfatidil serina. Sin embargo, bajo algunas circunstancias, la célula puede sobrevivir pese a mostrar estas características, por lo que algunos autores aconsejan considerar la rotura de membrana plasmática como punto de no retorno y, en consecuencia, de muerte celular (Kroemer, El-Deiry et al. 2005).

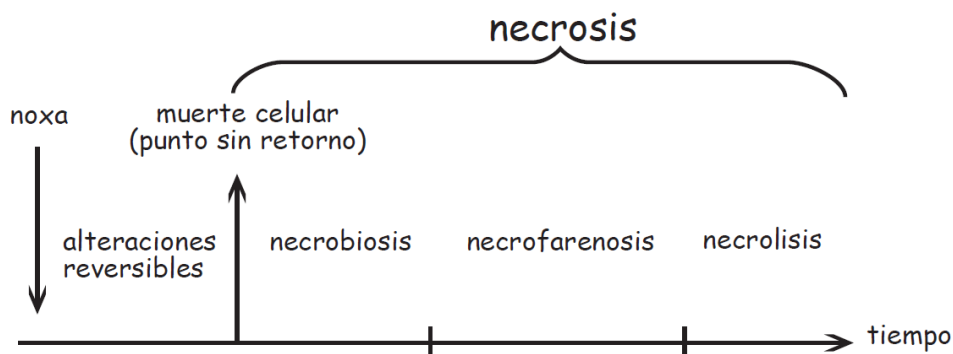


Figura II. El proceso de la muerte celular. Según los patólogos celulares, independientemente de la causa y forma de muerte, puede observarse un proceso que acontece después del estímulo nocivo hasta la desaparición de la célula. La muerte celular se establece en el punto de no retorno, a partir del cual la célula no puede recuperarse. Posteriormente se produce la necrosis, dividida en 3 estadios según los eventos morfológicos que acontecen: necrobiosis, necrofarenosis y necrolisis. Durante la necrobiosis la célula aún no muestra signos externos de su muerte. En la necrofarenosis la célula pierde su morfología externa permitiendo apreciar su muerte y finalmente, durante la necrolisis, se produce la disolución del material celular. Modificado de http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_031.html.

La muerte celular forma parte de la homeostasis y del desarrollo del organismo. De hecho, las células tienen una vida limitada, aunque su duración es muy variable, con tipos celulares que mueren pocas horas tras su maduración, como los leucocitos eosinófilos y neutrófilos, y otros tipos, como las neuronas, que persisten toda la vida del organismo o incluso más tiempo si se trasplantan a otros individuos (Magrassi, Leto et al. 2013). La muerte celular también puede producirse de forma accidental, por una causa externa a la célula (infección de patógenos, radiación ultravioleta, traumatismo, falta de nutrientes, estrés oxidativo...), o por una causa interna (por ejemplo, por fallos en el ciclo celular). Esta dicotomía entre muerte “normal” y accidental llevó a diferentes patólogos de la segunda mitad del XIX a descubrir la existencia de diferentes tipos de muerte celular. Así, en 1859, Virchow describía un tipo de muerte causado por la vida en contraposición a un proceso de muerte violenta (gangrena y mortificación): *“death brought on by (altered) life— a. spontaneous wearing out of living parts — the destruction and annihilation consequent upon life — natural as opposed to violent death (mortification)”* (Virchow 1859). Actualmente, se diferencian dos tipos de muerte principales: la oncosis (tradicionalmente denominada necrosis; (Majno and Joris 1995; Levin 1998)) y la muerte celular programada.

La oncosis es un proceso de muerte pasiva, producida generalmente por traumatismos, isquemia, infecciones y algunos tipos de agentes tóxicos. Presenta características morfológicas muy diferentes a los procesos de muerte celular programada (Weerasinghe and Buja 2012). Así, la oncosis está caracterizada por una marcada tumefacción de la célula, pérdida de la estructura citoesquelética y formación de vacuolas citoplasmáticas. El retículo endoplasmático se dilata, la mitocondria se deforma y los ribosomas y las membranas de los orgánulos citoplasmáticos se disgregan. En el núcleo se produce la condensación de la cromatina (pyknosis) y la posterior fragmentación del núcleo (karyorrhexis). Finalmente la ruptura de la membrana plasmática lleva a la dispersión del material celular, que producirá la inducción del proceso inflamatorio (Kung, Konstantinidis et al. 2011). Bioquímicamente, la oncosis está asociada a una reducción del ATP intracelular y al cese de la actividad de las bombas de iones en la membrana mitocondrial (Trump, Berezsky et al. 1997; Fink and Cookson 2005)

Al contrario que la oncosis, la muerte celular programada consiste en un proceso biológico activo, que depende de la activación de mecanismos moleculares específicos

que llevan a la célula al suicidio. En los organismos pluricelulares, este proceso de muerte celular es fundamental para el correcto desarrollo embrionario, la morfogénesis y el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto (Vaux and Korsmeyer 1999; Degterev and Yuan 2008).

La muerte celular programada puede producirse de diferentes maneras, según los mecanismos que la célula activa para llevar a término su suicidio. Las primeras definiciones y clasificaciones de los tipos de muerte celular programada se hicieron basándose en características morfológicas. Sin embargo, se ha comprobado que en la muerte celular un mismo cambio morfológico puede ser producido por diferentes procesos bioquímicos (Galluzzi, Maiuri et al. 2007; Green, Ferguson et al. 2009; Kroemer, Galluzzi et al. 2009). De esta manera, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) (Galluzzi, Vitale et al. 2012) atiende principalmente a criterios bioquímicos para clasificar la muerte celular programada. No obstante, advierte que estos métodos bioquímicos, pese a tener grandes ventajas a la hora de valorar el tipo de muerte celular respecto a las técnicas morfológicas, tiene también inconvenientes, no pudiéndose tomar un único proceso bioquímico como señal inequívoca de un tipo de muerte, ya que algunos son comunes a varios tipos de muerte celular y pueden producirse también sin que tengan como resultado final la muerte de la célula. La combinación de criterios bioquímicos y morfológicos ha permitido distinguir los siguientes procesos de muerte celular (figura I2):

Apoptosis. Es la forma de muerte celular programada que ha centrado mayor atención y ha sido mejor caracterizada. Presenta características morfológicas y bioquímicas bien definidas y desempeña un papel fundamental en el desarrollo y la homeostasis de organismos pluricelulares. Morfológicamente se caracteriza por una disminución del volumen celular y la formación de vesículas que serán fagocitadas, por lo que no inducen respuesta inflamatoria. Sus características bioquímicas y propiedades serán ampliadas en el siguiente apartado.

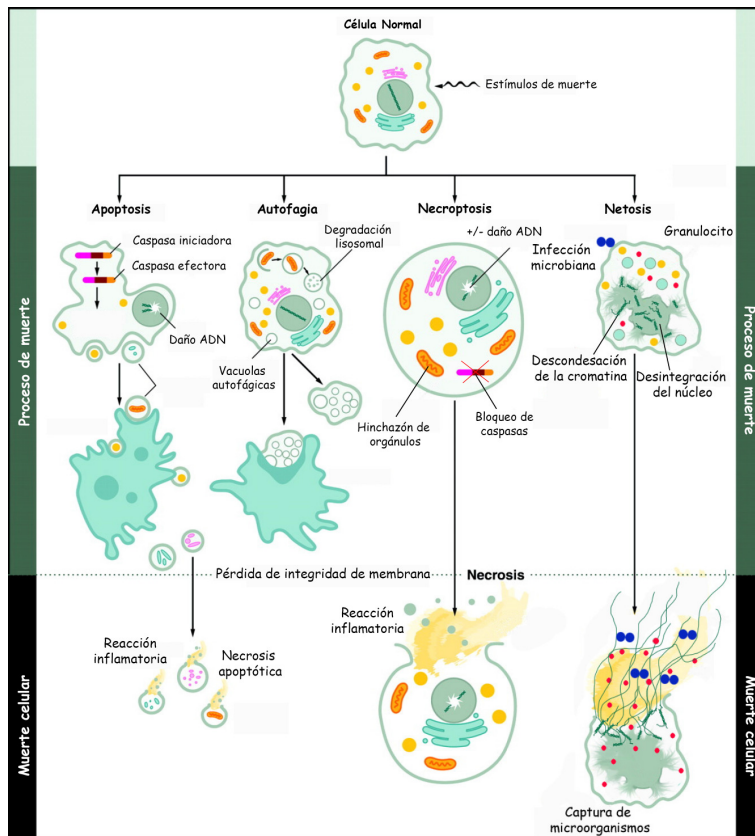


Figura 12. Tipos de muerte celular programada. Las células responden a los estímulos nocivos iniciando diferentes tipos de muerte celular. Estas vías siguen unos patrones morfológicos y bioquímicos propios. Cuando al final de estos procesos hay una rotura de la membrana plasmática, con liberación de material citoplasmático al medio, se produce necrosis, que activa los mecanismos inflamatorios. (Modificado de 2005, Fink).

Muerte celular autofágica. La autofagia es una vía degradativa lisosomal que puede actuar como respuesta adaptativa de la célula a situaciones de estrés como la falta de nutrientes. Si la célula no es capaz de sobreponerse a esta situación desfavorable, la autofagia puede causar la muerte de la célula (Boya, Gonzalez-Polo et al. 2005), aunque existe controversia al respecto (Levine 2005).

Necroptosis. Recientemente se ha descrito que la oncosis puede producirse de una manera activa y regulada, manteniendo sus características morfológicas, pero con la participación de proteínas específicas.

Netosis. Es un proceso de muerte específico de granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) que se produce cuando, en respuesta a determinados estímulos, estos glóbulos blancos liberan cromatina nuclear, histonas y proteínas antimicrobianas granulares para generar estructuras microbicidas denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (*Neutrophil Extracellular Traps, NETs*) (Yousefi, Gold et al. 2008). La producción de estas trampas provocan la muerte del granulocito.

Se han descrito otras formas de muerte celular programada con características de activación propias. Sin embargo, dado que convergen posteriormente en alguno de los procesos de muerte celular descritos anteriormente, no son considerados como un tipo de muerte celular en sí mismos. En esta categoría encontramos la catástrofe mitótica (muerte celular producida por una mitosis aberrante), anoikis (muerte de células adherentes en respuesta a la falta de interacción con la matriz), entosis (muerte provocada por la pérdida de interacciones célula-célula), parthanatos (muerte mediada por enzimas de respuesta a daño en el ADN, fundamentalmente PARP1), pyroptosis (descubierta al estudiar la muerte celular provocada por infecciones bacterianas) y la cornificación (proceso de diferenciación terminal de los keratinocitos para formar la capa exterior de la piel o *stratum corneum*).

3.2 APOPTOSIS

3.2.1 Descubrimiento y características morfológicas

El término apoptosis apareció en el campo de la biología por primera vez en 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972) para describir un proceso de muerte celular con unas características concretas que lo diferenciaban de la necrosis (i.e. oncosis) conocida hasta el momento. Este proceso se producía de forma regular en el organismo bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Las células que seguían el proceso apoptótico mostraban al microscopio rasgos morfológicos (figura I3) como la condensación del citoplasma y de la cromatina en el núcleo (pyknosis) (Kerr, Wyllie et al. 1972), que se contraponían a la degradación desordenada de la oncosis. En los últimos estadios de este proceso se observaba la fragmentación de la célula para formar los cuerpos apoptóticos con material celular diverso en su interior, que eran en último término fagocitados por células especializadas llamadas entonces “histiocitos” (macrófagos, células parenquimales o células neoplásicas) (Kerr 1971).

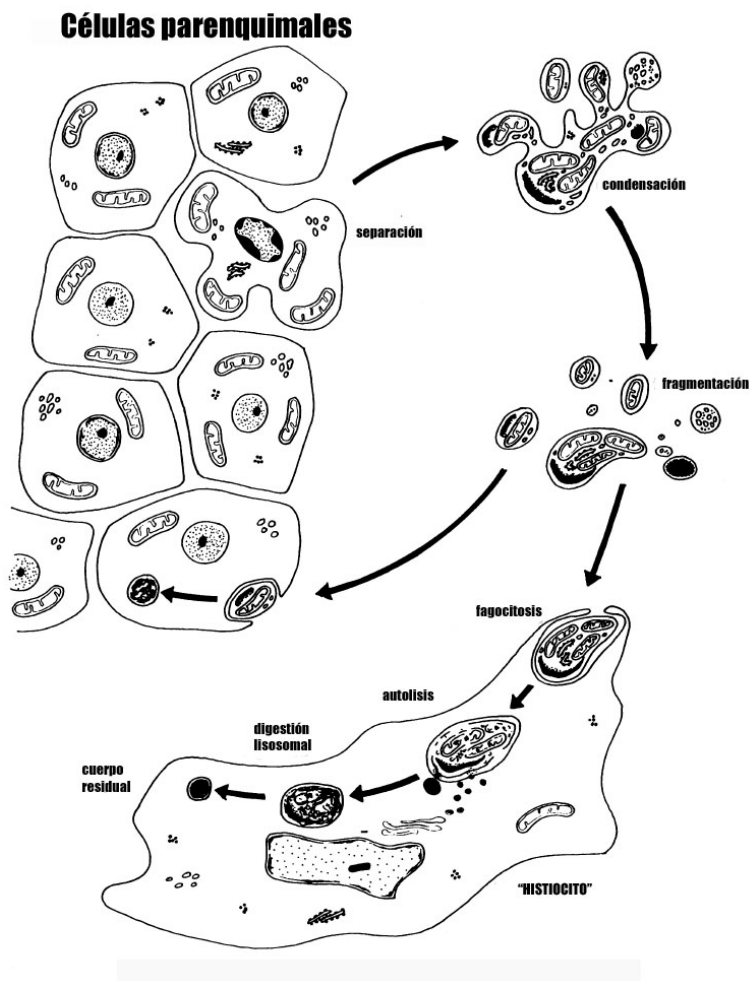


Figura I3. Diagrama de las características morfológicas de la apoptosis. Adaptado de Kerr, Wyllie *et al.* 1972.

Estas primeras características se han ampliado a lo largo de los años y han servido para definir la apoptosis como un proceso degenerativo de una célula asociado a la siguiente serie de eventos morfológicos bien diferenciados (ver comparación con oncosis en tabla I1):

- En primer lugar, las células retraen los pseudópodos, reducen su volumen y pierden contacto con las células vecinas. Esto es causado por la pérdida de agua debido al flujo osmótico hacia el espacio extracelular producido por la desregulación de los sistemas de transporte iónico (Lang, Foller *et al.* 2005).
- Posteriormente, las cisternas del retículo endoplasmático liso se dilatan y pueden llegar a fusionarse con la membrana plasmática.
- En algunas ocasiones, la membrana exterior de la mitocondria se permeabiliza, perdiendo el potencial transmembrana y liberando proteínas que favorecen el proceso apoptótico.

APOPTOSIS (Proceso dependiente de ATP. Participación activa de componentes celulares y biosíntesis de proteínas)	NECROSIS (ONCOSIS) (Proceso energéticamente pasivo. No se requiere la biosíntesis de nuevas proteínas)
Suele producirse en células aisladas	Suele afectar a muchas células contiguas del mismo tejido
Muerte fisiológica. Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. No ocurre durante el desarrollo.
Proceso muy regulado y controlado. Sigue un orden específico de eventos.	Proceso no regulado. La célula se desintegra caóticamente.
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares.	Inducida por un daño celular o tisular.
Redondeamiento de la célula, retracción de pseudopodos. Reducción del volumen celular.	La célula aumenta el volumen celular, se hincha.
Formación de protuberancias en la membrana plasmática (<i>Blebbing</i>), manteniendo su integridad.	Pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Las proteínas del citoesqueleto se desorganizan.
Organulos citoplasmáticos no sufren cambios estructurales.	Dilatación y lisis de orgánulos citoplasmáticos
Condensación de la cromatina (<i>pyknosis</i>). Fragmentación internucleosomal del DNA genómico y fragmentación del núcleo (<i>karyorrhesis</i>)	Dilatación de la membrana nuclear y condensación de la cromatina (<i>pyknosis</i>) en áreas pequeñas e irregulares. Fragmentación del núcleo (<i>karyorrhesis</i>) y posterior degradación de sus componentes (<i>karyolisis</i>)
Liberación de vacuolas (<i>Shedding</i>) conteniendo porciones citoplasmáticas y orgánulos subcelulares (cuerpos apoptóticos). No se produce inflamación .	Liberación del contenido celular al medio extracelular. Inflamación local. Globulos blancos son atraídos a la zona.
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos, por células vecinas o por fagocitos. Si los cuerpos apoptóticos no son fagocitados provocan necrosis secundaria (necrosis apoptótica).	Lisis celular, y daño a las células vecinas.

Tabla II. Diferencias morfológicas entre los procesos de apoptosis y oncosis. Modificado de M.A. Lizarbe (Lizarbe Iracheta 2007).

- Se produce la formación de agregados proteicos insolubles por entrecruzamiento de proteínas citoplasmáticas debido a la actividad de transglutaminasas de tejido sobreexpresadas durante la apoptosis (Autuori, Farrace et al. 1998).
- En el núcleo, la cromatina se condensa (*pyknosis*) y se acumula en la periferia de la envoltura nuclear. El nucleolo se desintegra en partículas osmiófilas (que se tiñen de un color oscuro con tinción de tetraóxido de Osmio). Se produce la fragmentación nuclear (*karyorrhesis*) por las endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el ADN entre nucleosomas originando fragmentos de un tamaño múltiplo de entre 180 y 200 pares de bases. Esto produce un patrón de ADN en escalera al analizarlo mediante electroforesis (Bortner, Oldenburg et al. 1995).
- Las células apoptóticas secretan moléculas como la lisofosfatidilcolina que reclutan macrófagos (Ravichandran and Lorenz 2007). Paralelamente, exponen moléculas como el lípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática que sirven de señal para que la célula sea reconocida por los macrófagos, así como por las células parenquimales o las

neoplásticas. Esta molécula ha sido ampliamente usada en biología molecular para la detección de apoptosis, junto con otras proteínas que también se externalizan, como la Anexina-I y la calreticulina (Elmore 2007).

- En la membrana plasmática se generan unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas (*blebbing*, ver en figura I4) debido a la degradación de proteínas del citoesqueleto (Doonan and Cotter 2008).
- Finalmente, se forman los denominados cuerpos apoptóticos, fragmentos de citoplasma rodeado de membrana citoplasmática intacta (impermeable a colorantes vitales), que contienen fragmentos de orgánulos citoplasmáticos y cuerpos densos granulares que corresponden a fragmentos nucleares (Taylor, Cullen et al. 2008). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por células vecinas o células especializadas como los macrófagos. De esta manera se evita que el proceso de necrosis secundaria disemine el material citoplasmático e induzca la liberación de citoquinas proinflamatorias (Fadok, Bratton et al. 1998; Kurosaka, Takahashi et al. 2003).

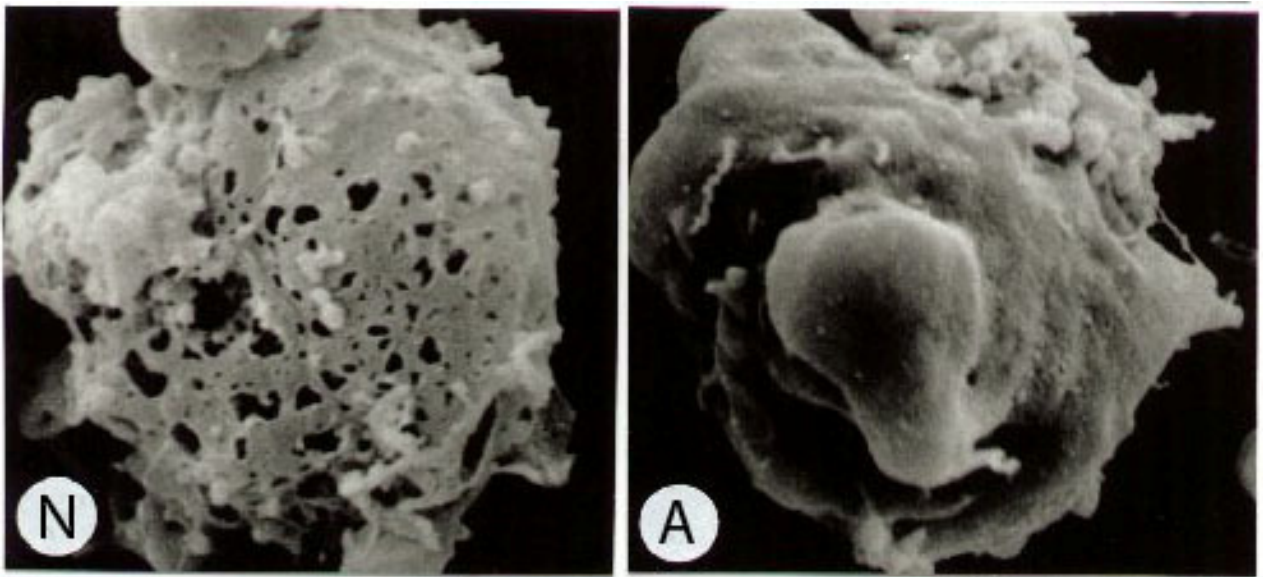


Figura I4. Superficie externa de células en proceso de muerte. N: Célula necrótica con numerosas lesiones en la superficie celular. A: Célula apoptótica con evidentes deformidades en la membrana (*blebbing*). Fotos tomadas con Microscopía electrónica de barrido (aumento: x 5,000). Fuente: http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto4/15_apop/data/chap10.htm

3.2.2 Características bioquímicas y vías de señalización

La apoptosis está caracterizada por una serie de procesos moleculares específicos controlados por genes que se han conservado filogenéticamente (Kerr, Wyllie et al. 1972; Vaux, Weissman et al. 1992; Vaux and Korsmeyer 1999). Los cambios

morfológicos descritos responden a la activación de vías de señalización que se inician cuando la célula recibe estímulos apoptóticos de origen externo y/o interno. Típicamente, estas vías apoptóticas concluyen con una extensa actividad proteolítica llevada a cabo por una familia específica de Cisteinil-ASpartato proteASAS denominadas caspasas, aunque, recientemente se han descrito procesos apoptóticos independientes de ellas (Galluzzi, Maiuri et al. 2007). Las caspasas son un grupo de cisteín proteasas que se sintetizan a modo de zimógenos y se activan por proteólisis (figura I5). En mamíferos se conocen 14 caspasas diferentes. Aunque las más estudiadas están implicadas en apoptosis, otras participan en procesos de inflamación y otros procesos más o menos conocidos. Las caspasas implicadas en apoptosis constan de 3 dominios principales, un dominio N-terminal de longitud variable (prodominio) y una región catalítica formada por una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10) de aproximadamente 20 y 10 kDa respectivamente (LeBlanc 2003). En su forma completa (pro-caspasas), las caspasas son inactivas y deben activarse por la rotura proteolítica de unas secuencias de aminoácidos que contienen un residuo de ácido

Caspasas apoptóticas en mamíferos.

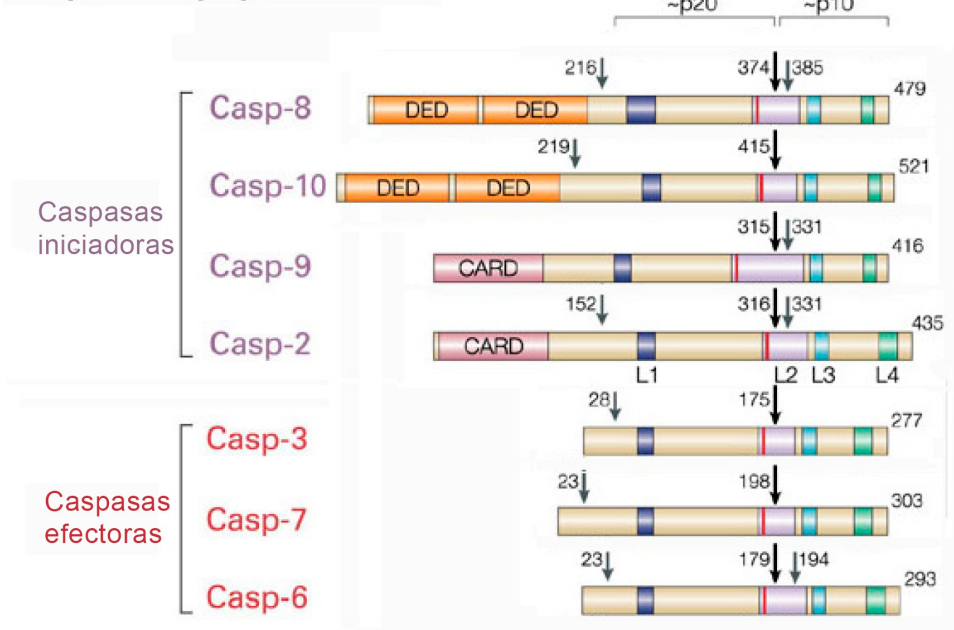


Figura I5. Representación esquemática de las caspasas apoptóticas presentes en mamíferos. Las caspasas están representadas a escala. La posición del primer corte interno entre la subunidad grande y pequeña esta marcado con una flecha mas gruesa, mientras que los demás cortes están representados por flechas mas estrechas. (Modificado de, Riedl, 2004)

aspártico y que se encuentran entre el prodominio y la subunidad grande, y entre esta última y la subunidad pequeña (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). La caspasa 9 es una excepción, que solo posee secuencias de activación entre la subunidad grande y pequeña. Una vez activadas, las caspasas forman heterotetrámeros compuestos por 2 subunidades grandes (~20 kDa) y 2 subunidades pequeñas (~10 kDa).

Entre las caspasas apoptóticas, se distinguen las denominadas caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9 y 10) y las efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener un prodominio de mayor longitud. Su función es integrar las señales apoptóticas internas (caspasa 9) o externas (caspasas 8 y 10) y activar a las caspasas efectoras que tienen como sustrato. Las caspasas efectoras se localizan constitutivamente en el citoplasma, formando dímeros inactivos. Estas caspasas necesitan el corte de un bucle que permite al sitio activo adquirir la conformación necesaria para ser totalmente activas (Shi 2004). Su activación inicia la rápida degradación celular, ejerciendo su actividad cisteín-proteasa sobre multitud de sustratos citoplasmáticos importantes para la viabilidad celular, como diversos inhibidores de apoptosis, proteínas de adhesión celular, proteínas del citoesqueleto, proteínas nucleares, del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, reguladores del ciclo celular, proteínas de mantenimiento del ADN y ARN, factores de transcripción, receptores de membrana y proteínas de transducción de señales. Además tienen como sustrato a caspasas iniciadoras, provocando una retroalimentación del proceso de muerte (Ferreira, Kreutz et al. 2012).

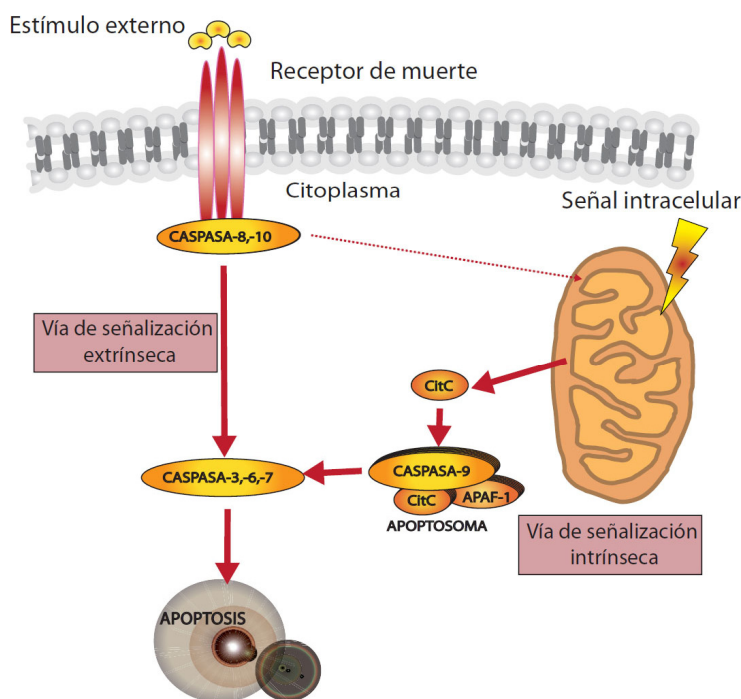


Figura 16. Esquema simplificado de las vías de señalización extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

Las vías de señalización de apoptosis pueden dividirse según el origen de las señales o estímulos que las inician. Así distinguimos entre la apoptosis extrínseca (estímulos externos) e intrínseca (estímulos internos) (figura I6).

La **vía intrínseca** se desencadena por estímulos internos como el daño en el ADN genómico, el desequilibrio de las concentraciones de Ca^{2+} , el estrés oxidativo o la acumulación de proteínas no plegadas en el retículo endoplasmático, entre otros. Aunque el origen de estos estímulos es muy diverso, todos ellos confluyen en la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) mediada por diversas proteínas, como el complejo de proteínas de la familia de Bcl-2, BAK y BAX, que causan la formación de poros en la membrana mitocondrial. La ruptura de la membrana mitocondrial causa la liberación de citocromo-c que continúa la cascada apoptótica uniéndose a la proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) para formar una plataforma molecular heptamérica denominada apoptosoma (Zou, Li et al. 1999; Chai and Shi 2014). Este complejo dependiente del aporte de energía en forma de ATP ó dATP (Riedl and Salvesen 2007) recluta moléculas de procaspasa 9, cuya proximidad física desencadena su dimerización y activación (Yuan, Yu et al. 2011; Chai and Shi 2014), y el consecuente corte y activación de las caspasas efectoras. El MOMP tiene consecuencias adicionales, como la disipación del potencial de membrana o la producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS). Asimismo, posibilita la liberación al citoplasma de proteínas mitocondriales que contribuyen a la progresión de la apoptosis, tales como SMAC/DIABLO y la serin-proteasa Omi/HtrA2 que facilitan la activación de caspasas o AIF (*Apoptosis Inductor Factor*) y endonucleasa G (ENDOG) que actúan de forma independiente de caspasas, desplazándose al núcleo e induciendo la fragmentación del DNA (Chautan, Chazal et al. 1999).

La **vía extrínseca** hace referencia a la inducción apoptótica por señales extracelulares de estrés a través de receptores de membrana plasmática, principalmente los denominados receptores de muerte, como FAS/CD95, TNF receptor 1 (TNFR1), TRAIL receptor (TRAILR), etc. Estos receptores responden a la unión de su ligando con un cambio conformacional en su parte citosólica, reclutando de esta manera a proteínas adaptadoras como FADD o TRADD y a las pro-caspasas iniciadoras 8 o 10, aunque la función de esta última todavía está en debate (Sprick, Rieser et al. 2002;

Fischer, Stroh et al. 2006; Parrish, Freel et al. 2013). Los complejos protéicos resultantes favorecen la dimerización de las pro-caspasas que proporciona la proximidad espacial necesaria para activarse mutuamente, estabilizando el dímero. Posteriormente se escinden de las moléculas adaptadoras, rompiendo la unión con sus prodominios para liberarse las formas activas de caspasa 8 o 10 constituidas por dos subunidades p18 y 2 subunidades p10 (Oberst, Pop et al. 2010; Lavrik and Krammer 2011) que activan a las caspasas efectoras para iniciar la proteólisis de la célula. Además de los receptores de muerte, la vía extrínseca también se puede activar a través de los denominados receptores de dependencia (receptores de netrina UNC5A-D y “*deleted colorectal carcinoma*” DCC) que inducen esta vía cuando la concentración de su ligando en el medio extracelular desciende por debajo de ciertos niveles (Mehlen and Bredesen 2011).

La apoptosis está fuertemente controlada por una red de interacciones entre las proteínas que forman parte de las vías apoptóticas, incluyendo tanto los componentes propios de la vía como las proteínas que regulan la actividad de estos componentes. Estas proteínas reguladoras se pueden dividir en anti-apoptóticas y pro-apoptóticas, según las consecuencias de sus interacciones. En el primer grupo se incluyen todas las proteínas que de manera directa o indirecta interfieren en la progresión de la apoptosis. Este grupo incluye numerosas proteínas, siendo las principales los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) y algunos miembros de la familia de Bcl-2. La familia de las IAPs contiene 8 miembros que actúan fundamentalmente a través de la inhibición de la actividad de las caspasas iniciadoras y efectoras específicas, aunque también pueden actuar sobre otros reguladores pro-apoptóticos (Deveraux and Reed 1999). Por su parte, la familia de Bcl-2 incluye proteínas como Bcl-2 o Bcl-X_L capaces de bloquear la MOMP interaccionando con las proteínas BAK y BAX, encargadas de formar poros en la membrana mitocondrial externa (Czabotar, Lessene et al. 2014). En el lado opuesto, las proteínas pro-apoptóticas promueven la apoptosis tanto a través del bloqueo de proteínas anti-apoptóticas como favoreciendo directamente la progresión de las vías apoptóticas. Algunas, como SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi o AIF (*Apoptosis-inducing factor*), son mitocondriales y se liberan tras la MOMP (Galban and Duckett 2010). Estas proteínas tienen como diana a proteínas anti-apoptóticas como las IAPs, interfiriendo en su actividad (Abhari and Davoodi 2008). Existen también proteínas pro-apoptóticas citoplasmáticas, como, por ejemplo, Bad que bloquea a Bcl-2

y Bcl-X_L, liberando a BAK y BAX para permitir la formación de poros en la membrana externa mitocondrial (Yang, Zha et al. 1995). Otras, como Apaf-1, funcionan como proteínas adaptadoras, estabilizando o favoreciendo el reclutamiento de proteínas en los complejos proteicos que se forman durante la señalización de muerte, como el apoptosoma (Milovic-Holm, Krieghoff et al. 2007). Los niveles de expresión, la actividad, el estado transcripcional, etc... de todas estas proteínas definen un equilibrio de señales anti- y pro-apoptóticas. La ruptura de este equilibrio a favor de la apoptosis determina la muerte de la célula incluso en ausencia de estímulos apoptóticos mientras que, por el contrario, el desequilibrio a favor de factores anti-apoptóticos puede permitir la supervivencia de células en condiciones apoptóticas.

3.2.3 La apoptosis en condiciones fisiológicas y patológicas

La apoptosis participa en numerosos procesos durante el desarrollo y es fundamental para el correcto funcionamiento del organismo adulto. En el **desarrollo** es responsable de eliminar estructuras morfológicas específicas de determinados estadios o que no se requieren en uno de los dos sexos (Baehrecke 2002). Por ejemplo, en el desarrollo del sistema nervioso la apoptosis es responsable de eliminar el 50% de la población original de neuronas (Burek and Oppenheim 1999). Este ajuste permite al organismo optimizar las conexiones sinápticas y crear patrones neuronales eficientes (Nijhawan, Honarpour et al. 2000). Algo similar ocurre en la selección de linfocitos T y B en el **sistema inmune**. En el timo y médula ósea se produce una selección negativa de los linfocitos T y B respectivamente, eliminándose por apoptosis aquellos que no son capaces de reconocer antígenos eficientemente o que por el contrario reconocen células propias como ajenas (Mackay, Leskovsek et al. 2008). La apoptosis también juega un papel fundamental en la **respuesta inmune**. Así, por ejemplo, frente a una infección viral, las células infectadas expresan proteínas de membrana informando de su condición al sistema inmune. Este, mediante células NK (*Natural Killer*) o citoquinas solubles, inducen la apoptosis de las células afectadas para detener el avance de la infección (Barber 2001).

La apoptosis actúa como último recurso en células en las que se ha producido un daño en el ADN (**daño genotóxico**). Estos errores se intentan subsanar por la maquinaria celular encargada de su reparación, pero si no es posible, las células se

eliminan por apoptosis (Roos and Kaina 2006). De forma similar, la apoptosis se induce tras los fallos del ADN asociados al **envejecimiento celular**. Por ejemplo, las alteraciones del ADN mitocondrial debidas a las especies reactivas de Oxígeno (ROS) provocan la activación del proceso apoptótico mediante la liberación al citosol de citocromo C y/o AIF. Igualmente, en el núcleo, el acortamiento de telómeros a lo largo de la vida de la célula se traduce en una pérdida de la estabilidad de la cromatina que puede producir la muerte apoptótica, posiblemente mediada por el aumento de niveles activados del factor de transcripción p53 (Aubert and Lansdorp 2008).

La apoptosis también participa en numerosas patologías. Su alteración, tanto por inhibición como por sobreactuación, subyace a cuadros patológicos tan relevantes como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, por citar algunos ejemplos (Fadeel and Orrenius 2005). En el caso del cáncer, las células tumorales comúnmente muestran deficiencias en los mecanismos que activan la apoptosis, bien expresando proteínas anti-apoptóticas o alterando la expresión o función de proteínas pro-apoptóticas. En el primer caso encontramos ciertas formas de linfomas de células B que sobreexpresan Bcl-2 (Vaux, Cory et al. 1988). En el segundo caso, encontramos algunos tumores que resisten a la activación de la apoptosis alterando la respuesta del receptor de muerte Fas a su ligando, bien por el bloqueo de su expresión, o por mutación de su secuencia. Esto provoca que los linfocitos T y NK encargados de destruir estas células mediante este receptor se vuelvan ineficaces frente al progreso del proceso tumoral (Cheng, Zhou et al. 1994; Elnemr, Ohta et al. 2001). En el extremo opuesto, el exceso de activación de la vía apoptótica está estrechamente relacionado con las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer está caracterizada por una agregación neurotóxica del péptido β -amiloide en placas extracelulares que induce apoptosis, vía estrés oxidativo o aumentando la expresión de FasL en neuronas y células gliales (Lev, Melamed et al. 2003). También puede activar la microglía resultando en la secreción de $\text{TNF}\alpha$, que activa la vía apoptótica extrínseca a través de su receptor TNFR1 (Ethell and Buhler 2003).

La apoptosis también contribuye de forma importante a la fisiopatología de traumatismos, como la lesión medular. Los modelos murinos han demostrado que las alteraciones de los flujos iónicos, la isquemia, la presentación de citoquinas como Fas ligando o $\text{TNF}\alpha$, etc inducidas por el trauma medular desencadenan una oleada de

muerte apoptótica conocida como muerte secundaria (Crowe, Bresnahan et al. 1997; Profyris, Cheema et al. 2004; Keane, Davis et al. 2006). Este proceso se prolonga durante semanas o incluso meses extendiendo la pérdida celular y tisular a regiones inicialmente intactas y contribuyendo de forma fundamental a las pérdidas funcionales de la lesión. La importancia de la apoptosis es tal en todas estas patologías que su modulación se considera una estrategia terapéutica fundamental en cáncer (Wong 2011), enfermedades neurodegenerativas (Nijhawan, Honarpour et al. 2000; Galluzzi, Vanden Berghe et al. 2011) o traumatismos del sistema nervioso central (Rowland, Hawryluk et al. 2008).

3.3 La vía extrínseca y los receptores de muerte celular

Como ya se mencionó anteriormente, la apoptosis extrínseca es inducida por una señal extracelular reconocida por receptores de muerte de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), que incluye a los receptores TNF 1 (TNF-R1/p55/DR1/ CD120a/p60), Fas (CD95/APO-1/DR-2), TRAIL-R1 (TNFRSF-10a, DR-4), TRAIL-R2 (TNFRSF-10b, DR-5), DR3 (Wsl-1/APO-3/TRAMP/LARD/TNFRSF25) y DR6 (TNFRSF21) (Lavrik 2011) (figura I7). Esta superfamilia de receptores posee una región citosólica que sirve de punto de anclaje para interactuar con proteínas citosólicas e iniciar la señalización apoptótica. Los receptores de muerte forman homotrímeros en la membrana celular donde se produce la unión de sus ligandos. Cuando esto ocurre se produce un cambio conformacional intracelularmente que induce el reclutamiento de proteínas citosólicas (Papoff, Hausler et al. 1999; Chan, Chun et al. 2000; Siegel, Frederiksen et al. 2000; Peter and Krammer 2003; Thorburn 2004). La unión de estas proteínas se realiza mediante uniones homotípicas y según el tipo de receptor se produce en los dominios TRAF (*TNF receptor associated factors*) o en los *Death Domain* (DD) (Locksley, Killeen et al. 2001). Como resultado se forman complejos proteicos que transmiten la señal apoptótica. Estos complejos se denominan DISC (*Death-inducing Signalling Complex*) en el caso de los receptores FAS, TRAILR1 y TRAILR2, o complejo II en el caso del receptor TNFR1. Este último receptor también forma un complejo alternativo con otras proteínas, denominado complejo I que, contrariamente al complejo II, activa la vía de supervivencia (Lavrik, Golks et al. 2005).

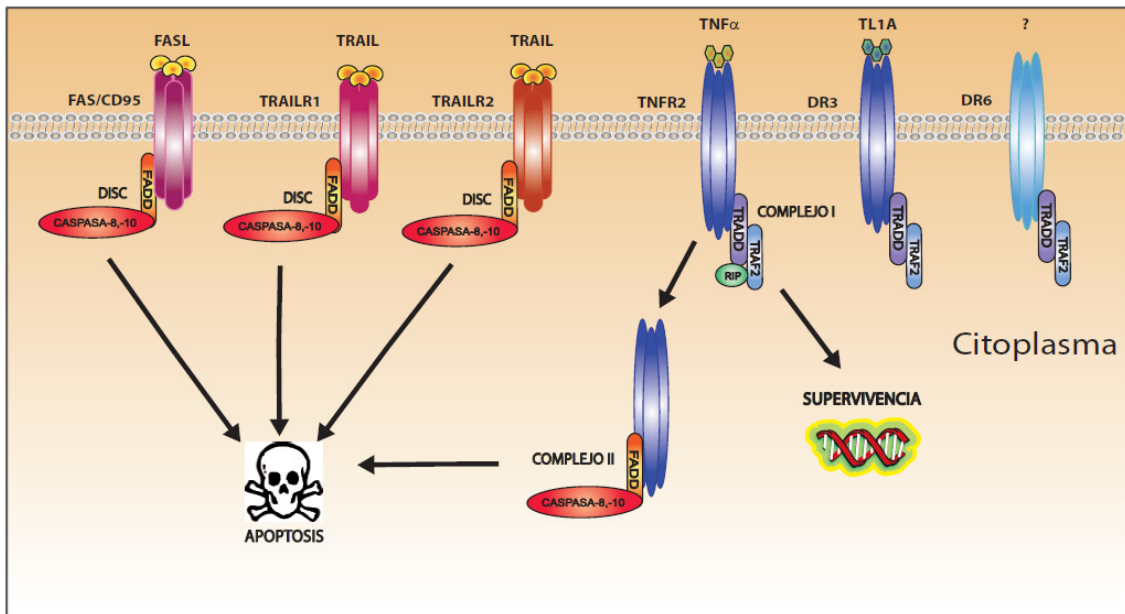


Figura 17. Representación esquemática de la familia de receptores de muerte en mamíferos.

3.3.1 La vía de muerte mediada por el receptor CD95/Fas

El receptor de muerte Fas/CD95 tiene como función principal la inducción de apoptosis y ha servido como paradigma de estudio de este grupo de receptores. Su ligando es CD95-L/Fas-L, una proteína transmembrana perteneciente a la familia de los factores de Necrosis Tumoral (TNF), cuyo extremo N terminal es intracelular, mientras que su extremo C-terminal se expone al exterior celular. Presenta un dominio de unión a otras moléculas FasL para formar homotrimeros igual que su receptor Fas/CD95. Está presente principalmente en la membrana de las células T del sistema inmune, destinado a inducir la muerte de sus células diana. También está presente en otros tipos celulares, por ejemplo en las neuronas del cerebro en desarrollo (Henkler, Behrle et al. 2005). FasL aumenta su expresión en situaciones de estrés a través de la vía de JNK (Pan, Zhao et al. 2007) o en condiciones patológicas, por ejemplo en la microglía y los linfocitos de pacientes de Parkinson o esclerosis múltiple (Watzlawik, Warrington et al. 2010). FasL existe también de forma libre en el medio extracelular al ser cortado de forma trimérica por metaloproteasas extracelulares como MMP-7 ó ADAM10, aunque es mucho menos eficiente en la activación del receptor Fas (Mitsiades, Yu et al. 2001; Schulte, Reiss et al. 2007; Kaufmann, Strasser et al. 2012).

La unión de FasL al receptor Fas, que se encuentra constitutivamente formando agrupaciones en balsas lipídicas, provoca que estas agrupaciones sean endocitadas (Eramo, Sargiacomo et al. 2004; Lee, Feig et al. 2006). Los endosomas resultantes dan lugar a estructuras llamadas receptosoma de Fas, que potencian la formación del complejo DISC (Schutze, Tchikov et al. 2008). La formación de este complejo depende de la unión de la proteína adaptadora FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*, también denominada Mort1) al receptor FAS/CD95 a través de su dominio DD. FADD también posee un dominio DED (*Death Efector Domain*), a través del cual recluta a la proforma de la proteasa caspasa 8 (pro-caspasa 8). Una vez unidas al DISC, las pro-caspasas 8 se encuentran en condiciones de proximidad óptimas para activarse mediante su dimerización y autoproteólisis (Hughes, Harper et al. 2009; Oberst, Pop et al. 2010; Lavrik 2011). Además de estos componentes básicos, otras proteínas que pueden formar parte del complejo DISC son:

- RIP1/RIPK1 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*): interacciona con el receptor Fas a través de su dominio DD, participando en la activación de la vía necroptótica (Holler, Zaru et al. 2000).
- DAXX (*Death-associated protein 6*): se une al receptor Fas y activa, a través de la proteína ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), la vía de stress JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) para inducir la apoptosis intrínseca a través de la mitocondria (Shen and Liu 2006).
- FLASH (*FLICE-associated huge protein*): esta proteína nuclear se desplaza al citoplasma para potenciar la señal apoptótica. Interacciona con los dominios DED de FADD y la caspasa 8, potenciando la señal apoptótica vía mitocondria. (Milovic-Holm, Krieghoff et al. 2007)
- FAF1 (*Fas Associated Factor-1*): se une al receptor Fas y a la proteína adaptadora FADD mediante sus dominios FID (Dominio de interacción a Fas) y DEDID (Dominio de interacción a DED) respectivamente. Como consecuencia estabiliza el complejo DISC y amplifica la señal de apoptosis.
- C-FLIP (*Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*): proteína homóloga a la caspasa 8, con 2 dominios DED, pero sin actividad catalítica y sin posibilidad de unión a sustratos, por lo que compete con la caspasa 8 para unirse a FADD e interferir en la señal apoptótica. Forma dímeros sin actividad catalítica con la caspasa 8 o con otras moléculas de c-FLIP, ensamblándose un complejo alternativo a DISC llamado

Complejo de Inhibición a Apoptosis (AIC). Es por tanto un regulador negativo de la apoptosis, muy estudiado como diana de tratamientos antitumorales (Safa 2012).

Una representación esquemática de esta vía de señalización se muestra en la figura I8.

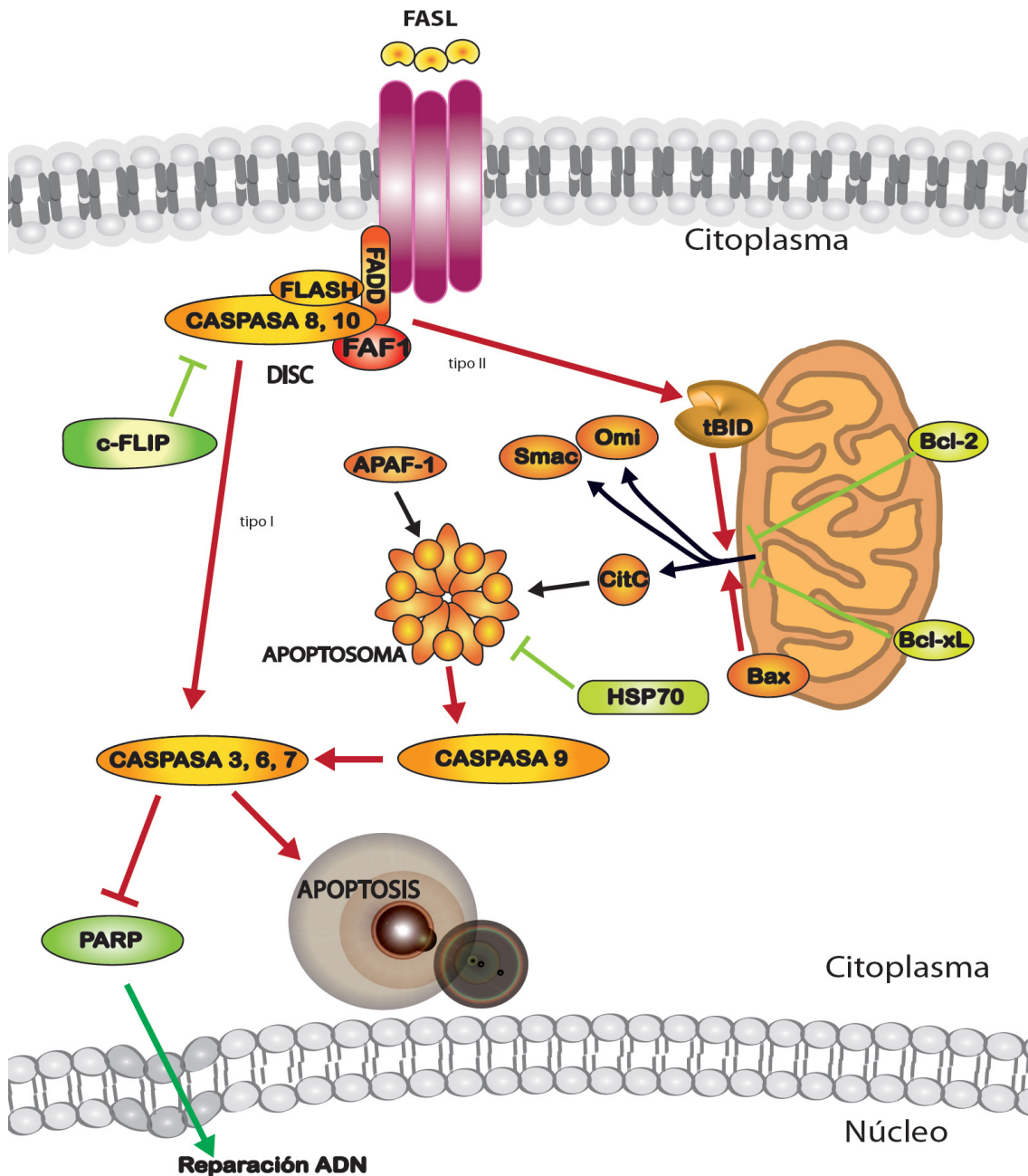


Figura I8. Representación esquemática de la vía de señalización de la apoptosis mediada por el receptor Fas/CD95. La unión del ligando de Fas/CD95, provoca la formación del DISC en la región citosólica del receptor, activando la vía de señalización que lleva a la activación de las caspasas efectoras y la apoptosis. Las flechas en negro indican el desplazamiento de proteínas, las flechas en rojo indican

activación pro-apoptótica, mientras que las verdes indican activación anti-apoptótica de proteínas o complejos. Las puntas de flecha planas indican inhibición.

Aunque la vía de Fas es el paradigma de la apoptosis extrínseca, se ha demostrado que en determinados tipos celulares necesita de la activación de la vía intrínseca para llevar a término la muerte de la célula. Atendiendo a la participación de la vía intrínseca en la transmisión de la señal apoptótica, se han distinguido dos tipos celulares (Barnhart, Alappat et al. 2003; Hao and Mak 2010) (Figura I9). Las células tipo I son células en las que la proteína caspasa 8 es activada por el complejo DISC y directamente activa a las caspasas efectoras 3 y 7, incluso segundos después de la activación (Scaffidi, Fulda et al. 1998). La vía intrínseca también es activada, pero no es necesaria para la inducción de apoptosis y, por tanto, en estas células la apoptosis no está inhibida por proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Bcl-X_L (Barnhart, Alappat et al. 2003). Células tipo I típicas son los timocitos y los linfocitos T maduros, y las líneas celulares humanas derivadas de ellos como las H9 (linfocito T cutáneo) o las SKW6.4 (linfocito B) (Kaufmann, Strasser et al. 2012).

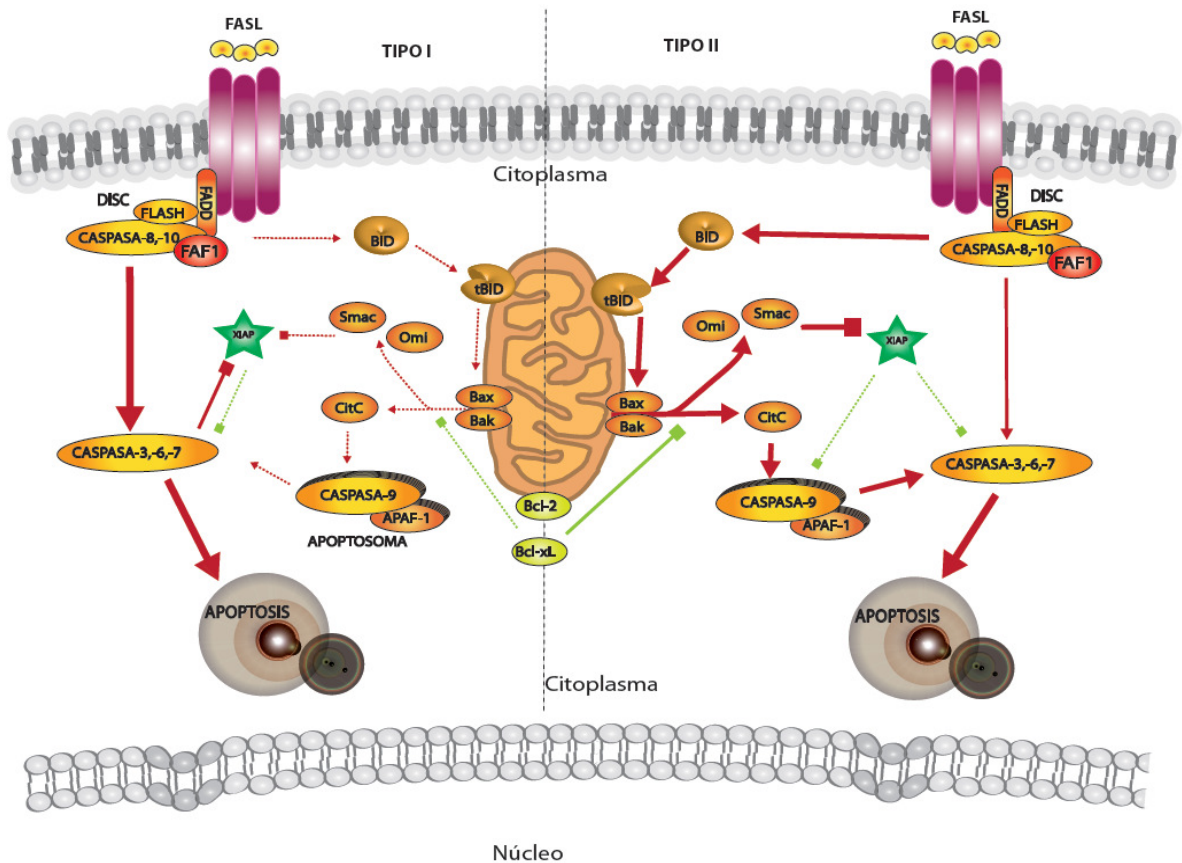


Figura 19. Representación esquemática de los tipos celulares I y II en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. La activación del receptor Fas/CD95 recluta al DISC que activará a las caspasas efectoras 3 y 7 directamente o a través de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). El color rojo y verde indica funciones pro y anti-apoptóticas respectivamente. El grosor de las líneas indica la relevancia de la función expresada para el tipo celular I o II.

Por su parte, las células tipo II tienen disminuida la activación de la caspasa 8 debido a la reducida formación del complejo DISC (Ryu, Lee et al. 2003) y/o por la reducida internalización y formación de receptosomas (Barnhart, Alappat et al. 2003). Para compensar este déficit, se amplifica la señal apoptótica a través de la alteración de la mitocondria y la activación de la vía intrínseca. En esta activación es característica la proteólisis de un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, el factor pro-apoptótico BID (*BH3 interacting-domain death agonist*), transformándose en tBID (BID truncado), capaz de inducir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial a través de la activación de Bak y Bax (Kim, Tu et al. 2009). Este evento produce la liberación de proteínas mitocondriales y la formación del apoptosoma (aunque algunos autores sostienen que su formación no es indispensable; ver (Shawgo, Shelton et al. 2009)), con activación de la caspasa iniciadora 9 y la subsecuente activación de las caspasas efectoras 3 y 7 (Chinnaiyan 1999). En estas células, las caspasas activas no son detectables hasta al menos 1 hora tras la estimulación. Los hepatocitos y las células β pancreáticas, al igual que líneas celulares como las tumorales HeLa (cáncer de cerviz

humano), Jurkat (linfocito T humano) y CEM (linfoblasto T humano) presentan este tipo de mecanismo.

En los últimos años se ha estudiado intensamente las características de estos dos tipos celulares. Según algunos autores (Hao and Mak 2010), realmente las células tipo I y tipo II corresponden a los extremos de un continuo en la dependencia de la vía intrínseca para la consecución de la muerte celular. Diversos aspectos parecen determinar esa dependencia, pero resulta clave la capacidad de la vía para activar directamente las caspasas efectoras. La activación de las caspasas 3 y 7 está determinada por diversos factores, principalmente por la cantidad de receptor Fas presente en la membrana celular, la eficiencia de la formación de DISC y su efectividad activando a la caspasa 8, así como por los niveles y actividad de las proteínas anti-apoptóticas c-FLIP y XIAP (Kaufmann, Strasser et al. 2012). Cuando la activación directa de las caspasas efectoras resulta ineficiente, la proteólisis de Bid por caspasa 8 cobra importancia activando la MOMP y liberando al citoplasma citocromo-c para formar el apoptosoma y activar las caspasas efectoras. También se liberan factores pro-apoptóticos como SMAC/DIABLO y Omi/HtrA2 que contribuyen a la activación de las caspasas efectoras bloqueando a las proteínas anti-apoptóticas. En este escenario, la proteína anti-apoptótica XIAP parece tener un papel determinante. Según Jost y colaboradores (Jost, Grabow et al. 2009), en las células tipo II los niveles de XIAP aumentan tras la estimulación, de forma coordinada con la activación de las caspasas efectoras, mientras que en las células tipo I sus niveles disminuyen rápidamente tras la estimulación.

3.3.2 Las vías de muerte y supervivencia mediadas por el receptor TNFR1

TNFR1 es un receptor de 55 KDa, presente en todas las células (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003) con una función ambivalente, capaz de transmitir tanto señal de supervivencia a través de la cascada de señalización de NF- κ B, como de promover la activación de caspasas y la muerte celular (figura I10). Su ligando es la citoquina homotrimérica TNF α , producida por distintos tipos celulares, principalmente por células del sistema inmunitario. Su unión a TNFR1, previamente trimerizado, provoca un

cambio conformacional en la región citosólica del receptor y la disociación de las proteínas bloqueadoras de los dominios de muerte celular del receptor, SODD (*Silencer of Death Domains*) (Carswell, Old et al. 1975; Laster, Wood et al. 1988; Chen and Goeddel 2002; Andera 2009). La liberación de los *Death Domains* de TNFR1 permite su unión homotípica con las proteínas adaptadoras TRADD y RIP1 y posteriormente con la proteína TRAF2 (*TNFR Associated Factor*) (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003; Zheng, Kabaleeswaran et al. 2010).

A partir de este complejo se activa la vía de supervivencia o la de apoptosis dependiendo, fundamentalmente, del estado de ubiquitinación del adaptador RIP1 (Wu, Liu et al. 2012). La unión de TNF α al receptor induce la rápida poliubiquitinación de RIP1 en Lys63 (ubiquitinación no asociada a degradación) protegiendo a la célula de la muerte celular y favoreciendo la vía de NF- κ B (Zhang, Blackwell et al. 2010). Entre las principales proteínas responsables de la ubiquitinación en Lys63 de RIP1 se encuentran las IAP, cIAP 1 y 2, así como la proteína adaptadora TRAF2, que suelen estar bloqueadas o degradadas cuando se induce la vía apoptótica (Naude, den Boer et al. 2011). Por el contrario, la no ubiquitinación en Lys63 de RIP es necesaria para la activación de la vía apoptótica. La apoptosis también es promovida por la proteína A20 que elimina las ubiquitinas en posición Lys63 (O'Donnell and Ting 2011) y además ubiquitina a RIP1 en Lys48, provocando así su degradación y contribuyendo a bloquear la señalización de NF- κ B. La degradación por ubiquitinación de RIP1 también se produce por acción de la proteína CARP-2 (Liao, Xiao et al. 2008).

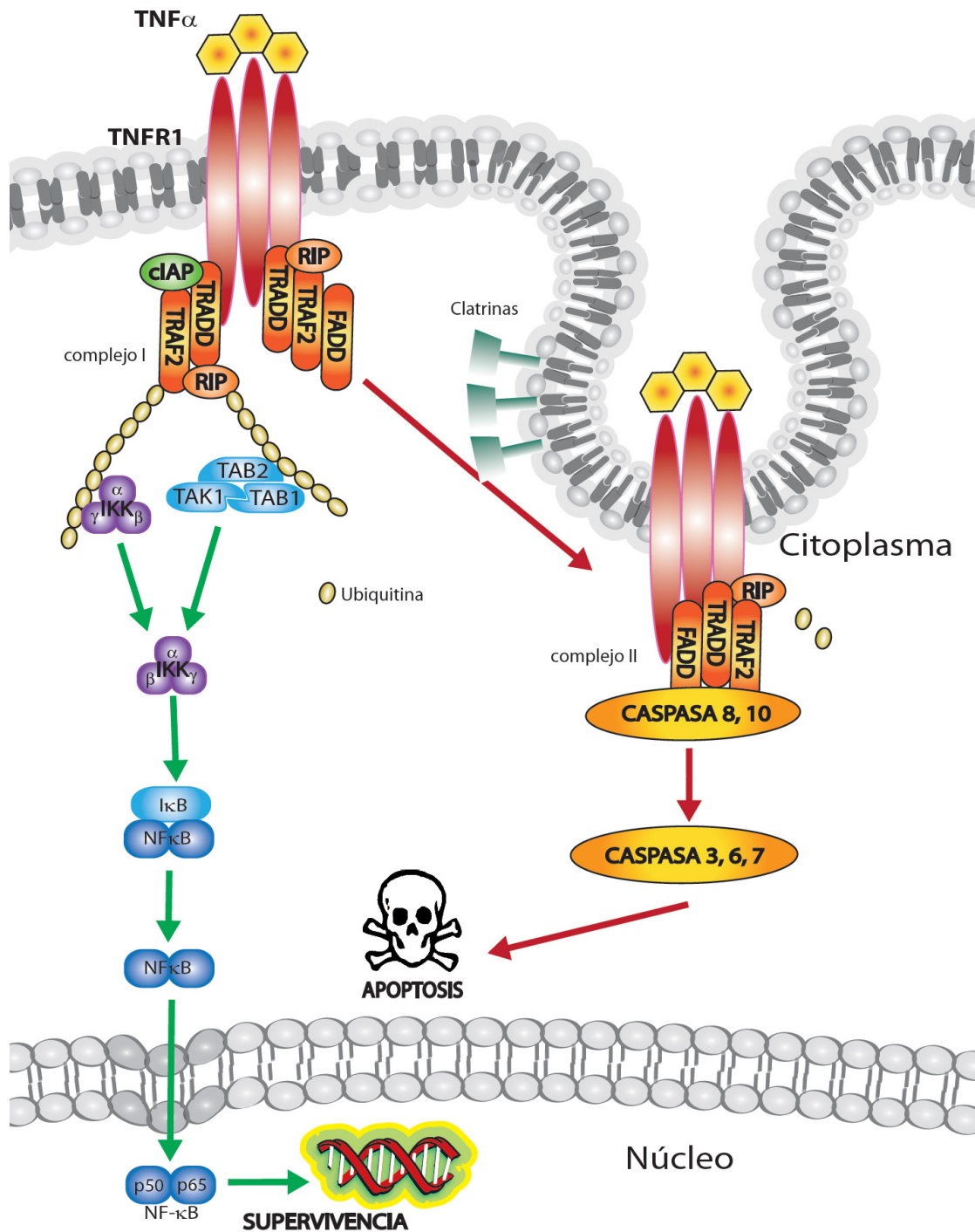


Figura I10: Esquema simplificado de señalización TNFR1. La unión del ligando TNF α al receptor TNFR1 puede activar tanto la vía de supervivencia de NF- κ B, como la apoptosis. La ubiquitinación de la proteína RIP juega un importante papel en la activación de una vía u otra. Los colores rojo y verde indican funciones pro y anti-apoptóticas respectivamente.

Cuando RIP1 se encuentra en un estado no ubiquitinado se producen varios eventos que, tras la señalización por TNF α , permiten el reclutamiento y activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, subsecuentemente, la activación de la **vía de apoptosis de TNFR1**. En este proceso se produce en primer lugar la internalización del complejo

TNFR1-TRAF2-RIP1-TRADD mediada por clatras (Schutze, Tchikov et al. 2008). La desubiquitinación de RIP1 también facilita la unión de las caspasas iniciadoras (O'Donnell and Ting 2011) que, junto con la proteína adaptadora FADD, dan forma al complejo II. La incorporación de FADD al complejo contribuye de forma decisiva a la incorporación y activación de las caspasas iniciadoras.

Al igual que en la vía Fas/CD95, la vía de TNFR1 también puede activar la vía apoptótica intrínseca. En este caso, el complejo II se internaliza en una vesícula que se fusiona con endosomas (Schutze, Tchikov et al. 2008), donde activa las esfingomielinasas aSMase y nSMase para generar ceramida. Este esfingolípido es capaz de truncar la proteína BID a través de la activación de la proteasa CTSD, generando la proteína tóxica tBID que provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial desencadenando la apoptosis intrínseca (Schutze, Tchikov et al. 2008).

En las situaciones en las cuales RIP1 se encuentra ubiquitinado, la unión del ligando TNF α desencadena **la vía canónica de NF- κ B** con funciones opuestas a la muerte celular. En estas condiciones, al pre-complejo de TNFR1, TRADD, RIP1 ubiquitinado y TRAF2 se unen las proteínas inhibidoras de apoptosis cIAP 1 y 2, formando el complejo I de señalización. Estas IAPs poseen un dominio RING con actividad E3 ubiquitin ligasa (Wajant, Pfizenmaier et al. 2003; Zheng, Kabaleeswaran et al. 2010) que media en la poliubiquitinación en Lys63 de los componentes del complejo I. Como consecuencia se crea una red de cadenas de poliubiquitina que sirve de andamiaje al que se unen los complejos IKK (quinasas IKK α , β y NEMO/IKK γ) y TAK1-TAB1/2. Este último complejo, a través de su subunidad quinasa TAK1, activa el complejo IKK fosforilando a la subunidad IKK β por un modelo de proximidad (Ea, Deng et al. 2006; Li and Lin 2008; Napetschnig and Wu 2013). IKK β también puede fosforilarse por la proximidad de dos complejos IKK, ya que tienen capacidad de auto-transfosforilarse (Perkins 2007; Haas, Emmerich et al. 2009). Una vez activado, el complejo IKK provoca la fosforilación de la proteína I κ B α , conduciendo a su degradación, liberando al complejo proteico NF- κ B que mantiene retenido en el citoplasma y, como consecuencia, permitiendo su entrada al núcleo. El complejo IKK también favorece el traslado al núcleo de NF- κ B y su interacción con otras proteínas a través de la fosforilación de la subunidad p65. Una vez en el núcleo, NF- κ B promueve

la expresión de genes involucrados en supervivencia e inflamación (Napetschnig and Wu 2013).

Este factor de transcripción también activa genes que regulan su propia vía de señalización, como el gen del inhibidor I κ B α que vuelve a secuestrar a NF- κ B en el citoplasma (Brasier 2006). También induce la expresión de las proteínas A20 y CYLD que eliminan ubiquitinas de RIP1, TRAF2 y NEMO (Jono, Lim et al. 2004; Krappmann and Scheidereit 2005; Wu, Conze et al. 2006; Li and Lin 2008). Por otra parte, NF- κ B también induce la expresión de proteínas que bloquean la señal apoptótica como el homólogo inactivo de caspasa-8, c-FLIP, que se une al complejo II de TNFR1 inactivándolo (Safa 2012). En toda esta vía, la proteína XIAP juega un papel importante activando los complejos IKK, acercando estos complejos mediante su unión a las cadenas de poliubiquitina Lys63 (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008) y uniéndose a la proteína TAB1 para formar el complejo XIAP-TAB1-TAK1 que activa los complejos IKK (Lu, Lin et al. 2007). Además elimina reguladores negativos de la vía como COMDD1, que bloquea a p65 en el núcleo (Mufti, Burstein et al. 2007). Finalmente, provoca una segunda activación de la vía NF- κ B mediante la interacción con la quinasa MEKK2 (Winsauer, Resch et al. 2008).

3.4 LA PROTEÍNA ANTI-APOPTÓTICA XIAP

La bibliografía de los últimos años evidencia la importancia de la proteína XIAP (*X-linked Inhibitor Apoptosis Protein*) en la regulación de la apoptosis. XIAP, también conocida como BIRC4 (*Baculoviral IAP Repeat (BIR) Containing Protein 4*), es uno de los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis IAPs. Esta familia fue descubierta a raíz de la identificación hace más de 20 años en baculovirus del gen *iap* cuando se investigaban homólogos funcionales de la proteína viral p35 en diversos baculovirus (Crook, Clem et al. 1993). Este gen codificaba el polipéptido IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), capaz de evitar la muerte de las células de insectos infectadas por este virus, favoreciendo la propagación viral. La búsqueda posterior de ortólogos de la secuencia de *iap* permitió descubrir los primeros miembros de la familia IAP en mamíferos e insectos (Uren et al. 1998).

Actualmente se conocen 8 proteínas dentro de la familia IAP en mamíferos (figura I11). La estructura de estas proteínas esta caracterizada por la presencia de un dominio de unos 70 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de Zinc, formando una estructura globular que consiste en cuatro o cinco hélices- α y un número variable de hojas β antiparalelas (Hinds, Norton et al. 1999). Estos dominios se denominaron BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) y permiten a las IAPs ser las únicas proteínas endógenas capaces de bloquear la actividad de las caspasas efectoras e iniciadoras. Además, 5 de los miembros contienen un dominio RING (*Really Interesting New Gene*), de estructura globular estabilizada por 2 átomos de zinc (Deshaies and Joazeiro 2009), que actua como ubiquitín ligasa E3 regulando la degradación de proteínas (Yang and Yu 2003). Las IAPs también pueden incorporar otros dominios relevantes para la inhibición de la apoptosis, como en el caso de las cIAP 1 y 2 que incorporan un dominio CARD de unión a caspasas (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008).

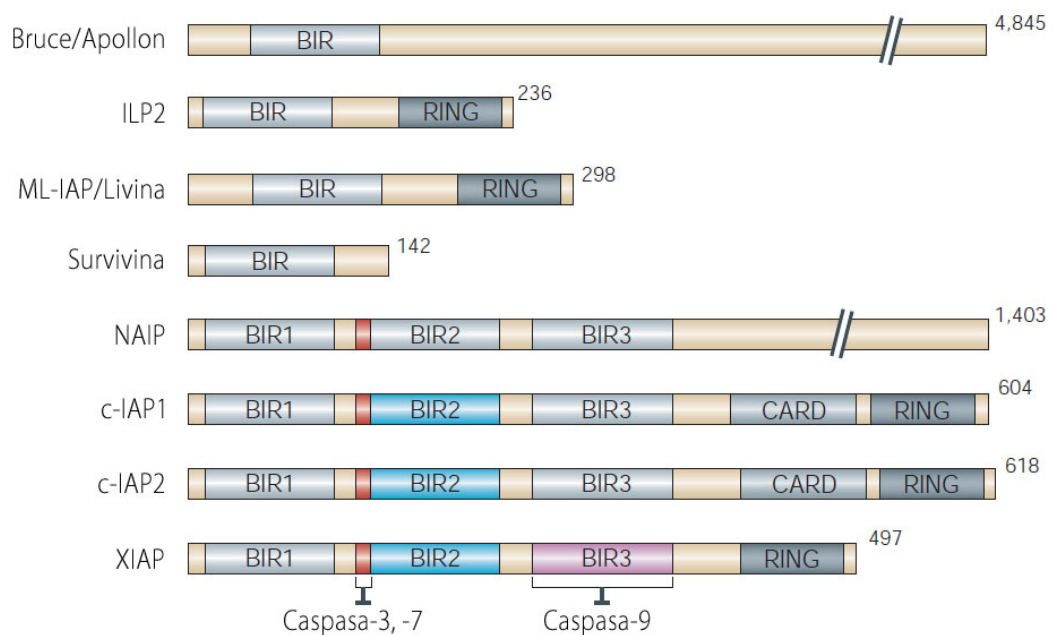


Figura I11. Proteínas de la familia de inhibidores de apoptosis (IAP). Esquema representativo de las proteínas XIAP (*X-linked IAP*), c-IAP1, c-IAP2, ILP2 (*IAP-like protein-2*), ML-IAP (melanoma IAP)/livina, NAIP (*neuronal apoptosis inhibitor protein*), survivina y BRUCE/Apollon, mostrando los dominios mas relevantes. Una secuencia conservada entre los dominios BIR1 y BIR2 de XIAP, NAIP, c-IAP1 y 2 (señalada en rojo) es responsable de la inhibición de las caspasas 3 y 7 en mamíferos. Sólo el dominio BIR3 de XIAP puede inhibir a caspasa 9.

Dentro de la familia de las IAPS, XIAP es el inhibidor endógeno con mayor afinidad a las caspasas través de sus tres dominios BIR, que le permiten unirse a las caspasas 3, 7 y 9, aunque no a las caspasas 1, 6, 8 o 10 (Deveraux, Leo et al. 1999).

XIAP también posee un dominio UBA (*Ubiquitin Associated Domain*) de unión a ubiquitina y un dominio RING en el extremo amino terminal que le permiten ubiquitinar a múltiples proteínas pro-apoptóticas para su degradación en el proteosoma (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008). La estructura de XIAP, incluyendo la posición de estos dominios y las principales proteínas con las que interacciona, se encuentra detallada en la figura I12.

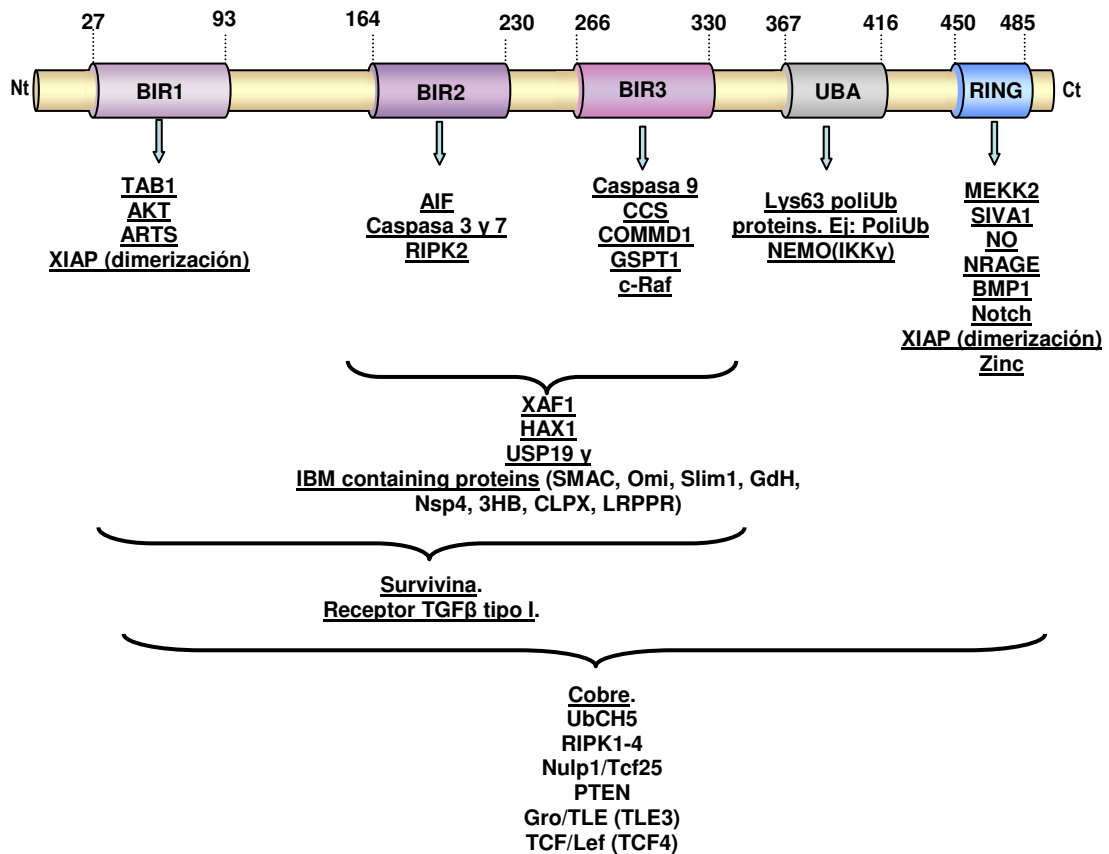


Figura I12. Esquema de los dominios e interacciones de la proteína XIAP. En la parte superior se muestran los aminoácidos que comprenden los dominios de la proteína XIAP. Bajo cada dominio o conjunto de ellos, se muestra una relación de proteínas que interactúan con dicho dominio. Las proteínas que no están subrayadas no tienen un dominio de unión descrito en la literatura. Nt y Ct indican los extremos N terminal y C terminal de la cadena de aminoácidos.

La proteína XIAP fue identificada en el año 1995 por Liston *et al.* (Liston, Roy et al. 1996) buscando homólogos de la proteína NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein*). El gen que la codifica está localizado en el brazo largo del cromosoma X, de donde recibe su nombre (*X-linked IAP*). Esta proteína está compuesta por 497 aminoácidos, con un peso molecular de 55 KDa. Es una proteína bastante ubicua pero se

expresa de forma desigual expresada en los diferentes tipos celulares. Por ejemplo, en el sistema inmune está ausente en los leucocitos de sangre periférica, pero es muy abundante en los macrófagos del timo (Vischioni, van der Valk et al. 2006). XIAP se distribuye generalmente por todo el citoplasmática (Liston, Fong et al. 2001), aunque en algunos tipos celulares como las neuronas se concentra en la región perinuclear (Lotocki, Alonso et al. 2003). Además se ha descrito presencia de XIAP en el núcleo (Phillipps and Hurst 2012), indicando que podría ser importado a esta región para desarrollar diferentes funciones.

3.4.1 Función

3.4.1.1 Muerte celular

La citoprotección de la proteína XIAP esta mediada por diferentes mecanismos que actúan a diferentes niveles de la vía apoptótica. Su principal función es el bloqueo y degradación de la caspasa iniciadora 9 y las efectoras 3 y 7. Para inhibir a la caspasa iniciadora 9, el dominio BIR3 de XIAP interacciona con la forma inactiva de esta caspasa (pro-caspasa 9), formando heterodímeros que impiden su activación evitando su unión al apoptosoma y su dimerización. Si la caspasa 9 es activada, el corte producido para formar los fragmentos grande y pequeño provoca un cambio estructural creando un nuevo sitio de unión, donde el dominio BIR3 se une y la bloquea (Zou, Yang et al. 2003). Además, mediante la actividad E3 ligasa de su dominio RING señala mediante ubiquitinas a la caspasa 9 activa para su degradación en el proteosoma (Shiozaki, Chai et al. 2003; Morizane, Honda et al. 2005; Galban and Duckett 2010).

A diferencia de la inhibición de caspasa 9, el bloqueo de las caspasas efectoras mediado por XIAP se produce mediante la unión de la región N-terminal adyacente a su dominio BIR2 con las caspasas 3 y 7. De esta manera, XIAP bloquea el sitio catalítico de las caspasas efectoras y evita su acción proteolítica sobre sus sustratos por oclusión estérica (Riedl, Renatus et al. 2001). Además, al igual que en el caso de caspasa 9, el dominio RING es capaz de ubiquitinar a estas caspasas marcándolas para su degradación en el proteosoma (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001).

Además de su actividad sobre las caspasas, XIAP también tiene actividad citoprotectora a través de la unión de los dominios BIR2-BIR3 con el dominio IBM (*IAPs Binding Motif*) de factores pro-apoptóticos mitocondriales como Omi/HtrA2 y SMAC/DIABLO (Ekert, Silke et al. 2001; Vande Walle, Lamkanfi et al. 2008). Estas proteínas liberadas tras la MOMP promueven la apoptosis impidiendo la unión de las IAPs, incluyendo XIAP, a las caspasa. Sin embargo, la unión de XIAP con estas proteínas también conduce a su ubiquitinación y degradación en el proteosoma (Fu, Jin et al. 2003; Srinivasula, Gupta et al. 2003). XIAP también es un factor decisivo en la respuesta de las células a la activación de la vía Fas/CD95, determinando si esta señalización puede activar directamente a las caspasas efectoras o si por el contrario depende de la vía intrínseca (tipos celulares I y II, respectivamente)(Jost, Grabow et al. 2009).

Adicionalmente, XIAP también es capaz de interferir en la apoptosis independiente de caspasas promovida por la forma truncada de la proteína AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*). En este proceso, la interacción del dominio BIR2 de XIAP con AIF (tanto de la forma completa no apoptótica como la truncada proapoptótica) y la subsecuente ubiquitinación de AIF mediada por el dominio RING de XIAP, aunque no causan su degradación, parecen alterar la capacidad enzimática de AIF reduciendo sus efectos apoptóticos (Wilkinson, Wilkinson et al. 2007).

3.4.1.2 Supervivencia

La función citoprotectora de XIAP no solo se produce mediante la inhibición de vías de muerte celular, sino que también se media por la activación de vías de supervivencia. Su acción es particularmente relevante en la vía de NF- κ B (Hofer-Warbinek, Schmid et al. 2000), actuando a varios niveles. Al inicio de la vía, dímeros de XIAP unidos a través de sus dominios BIR1 y RING se unen al complejo TAB1/2-TAK1 para inducir su activación. Este proceso se produce por la unión a través del dominio BIR1 a la subunidad TAB1 y activando a la quinasa TAK1 que fosforila IKK β (Lu, Lin et al. 2007). Además, al final de la vía, XIAP facilita la transcripción mediada por NF- κ B, eliminando por ubiquitinación y degradación proteosomal a reguladores negativos como COMMD1, que ubiquitina para su degradación a la subunidad p65 (Mufti, Burstein et al. 2007). Adicionalmente, XIAP induce una segunda ola de

activación de la vía NF- κ B ubiquitinando la quinasa MEKK2 en las lisinas 48 y 63, favoreciendo una nueva fosforilación del complejo IKK y liberando de nuevo a NF- κ B (Winsauer, Resch et al. 2008).

XIAP también parece participar en otras vías de supervivencia, como las mediadas por la proteína AKT/PKB. Los estudios de Asselin y colaboradores (Asselin, Mills et al. 2001) mostraron que la sobreexpresión de XIAP esta asociada a un aumento de la fosforilación y la señalización pro-supervivencia de AKT. Este efecto es indirecto, mediado por la actividad E3 ubiquitin ligasa de XIAP sobre PTEN que inhibe la fosforilación de AKT (Van Themsche, Leblanc et al. 2009). Curiosamente, la unión de AKT al dominio BIR1 de XIAP causa su fosforilación en el aminoácido 87, aumentando su estabilidad (Dan 2003).

3.4.1.3 Otras interacciones

Adicionalmente, XIAP interacciona con diversas moléculas para activar múltiples vías de señalización. Por una parte, a través de sus dominios BIR, XIAP interacciona con receptores de diversos miembros de la familia del factor de crecimiento TGF β (*Transforming Growth Factor β*), incluyendo los receptores tipo I de TGF β y de BMP (*Bone Morphogenetic Protein*). Como consecuencia, en el primer caso se potencia la activación de promotores de expresión génica de respuesta al factor de crecimiento TGF β (*Transforming Growth Factor β*), estimulando las vías JNK y/o NF- κ B (Reffey 2001). En el segundo caso, XIAP actúa como proteína adaptadora, reclutando al complejo TAB1-TAK1 al receptor de BMP que participa en proliferación, apoptosis, señalización Wnt, etc (Yamaguchi, Nagai et al. 1999). Por otra parte, XIAP promueve la vía canónica de Wnt, mediante la mono-ubiquitinación de Gro/TLE y la unión al factor de transcripción TCF4 para facilitar su unión a β -Catenina (Hanson, Wallace et al. 2012). Recientemente se ha descrito la interacción de XIAP con Mdm2, un regulador negativo de p53 (Huang, Wu et al. 2013). Según estos estudios, la interacción puede involucrar también al RNA mensajero de la secuencia IRES de XIAP y causa la inactivación de Mdm2 con importantes consecuencias tanto en la regulación del ciclo celular como en la vía autofágica.

Además de las rutas de señalización vistas hasta ahora, XIAP tiene otras funciones importantes. Sus interacción con la proteína COMMD1 y la chaperona de homeostasis del Cu^{2+} CCS, o directamente con el ión Cu^{2+} le permiten participar en la regulación de los niveles del cobre intracelular (Mufti, Burstein et al. 2007; Brady, Galban et al. 2010). La participación de XIAP es fundamental como ilustra la alteración de sus niveles en la enfermedad de Wilson y otros trastornos tóxicos del Cobre (Brady, Galban et al. 2010). También se ha descrito la implicación de XIAP en la respuesta inmunológica innata mediada por los receptores NOD 1 y 2. Estos receptores se activan por la presencia de patógenos e interaccionan con la quinasa RIPK2 (*Receptor Interacting Protein Kinase 2*) para inducir la vía NF- κ B. Según los estudios de Krieg y Damgaard (Krieg, Correa et al. 2009; Damgaard, Fiil et al. 2013), la activación de la vía depende de la unión (a través del dominio BIR2) de XIAP con RIPK2 y su posterior ubiquitinación. Un resumen de estas y otras interacciones de XIAP y sus consecuencias se incluyen en la tabla I3.

3.4.2 Regulación

La importancia de la actividad de XIAP sobre las vía de apoptosis y supervivencia y su implicación en otras vías como la activación de JNK1, MAPK, Wnt o el metabolismo del cobre requieren una regulación estrecha de esta proteína. La importancia de esta regulación queda ilustrada por las consecuencias patológicas de su desregulación, como en tumorigénesis y cancer (Kashkar 2010; Saleem, Qadir et al. 2013) o en enfermedades neurodegenerativas y metabólicas (Brady, Galban et al. 2010; Nakamura, Wang et al. 2010).

A nivel transcripcional, hay un control de XIAP a través de una secuencia IRES en su región 5'. Esta secuencia permite el aumento de expresión de XIAP en situaciones de stress y privación de alimento, cuando la expresión y traducción del resto de proteínas esta reprimida. De esta manera, la célula se asegura niveles suficientes de XIAP para su supervivencia (Holcik, Lefebvre et al. 1999; Hofer-Warbinek, Schmid et al. 2000; Holcik and Sonenberg 2005). En la última década se ha descubierto que la expresión de XIAP también está regulada por microRNAs. Algunas de estos RNAs de cadena corta, como miR-23a y miR-24, tienen la capacidad de reducir post-

transcripcionalmente la expresión de XIAP, modificando la sensibilidad de las células a los estímulos apoptóticos (Siegel, Li et al. 2011; Xie, Tobin et al. 2013).

El nivel de proteína, la estabilidad y degradación de XIAP esta regulada por diversos mecanismos que implican a numerosas proteínas. En primer lugar, los niveles de XIAP son regulados por la misma proteína, que se marca a sí misma por ubiquitinación y promueve su propia degradación en el proteosoma (Galban and Duckett 2010). En segundo lugar, los componentes de las vías apoptóticas también son capaces de inhibir y/o degradar a XIAP. Así, durante la activación de la apoptosis mediada por el receptor Fas, se ha observado que la caspasa 3 activa es capaz de cortar a XIAP entre los dominios BIR2 y BIR3, inactivándolo y, por tanto, creando una retroalimentación positiva de la señal de muerte celular (Ferreira, Kreutz et al. 2012). Por otra parte, la permeabilización de la membrana mitocondrial libera proteínas mitocondriales con dominios IBM (*IAPs Binding Motif*) capaces de unirse a los dominios BIR2 y 3 de XIAP, bloqueando su unión a caspasas e interfiriendo en su actividad anti-apoptótica. Entre estas proteínas (*IBM containing proteins*) las más conocidas son Omi/HtrA2 y SMAC/DIABLO pero también se incluyen otras como Slim1, GdH, Nsp4, etc (Galban and Duckett 2010). Además de su actividad inhibitoria, Omi/HtrA2 y SMAC/DIABLO también promueven la degradación de XIAP a través del proteosoma (Ekert, Silke et al. 2001; Srinivasula, Hegde et al. 2001; Vande Walle, Lamkanfi et al. 2008). Estas interacciones también posibilitan la ubiquitinación de las proteínas mitocondriales por el dominio RING de XIAP, promoviendo su degradación y estableciendo un equilibrio de reguladores pro y anti-apoptóticos que determina el destino celular (Martins, Morrison et al. 2004; Morizane 2005).

La MOMP también libera a la proteína mitocondrial ARTs que se une a los dominios BIR 1 y 3 de XIAP inhibiendo su unión a caspasas (Bornstein, Gottfried et al. 2011; Garrison, Correa et al. 2011). ARTs también promueve la degradación de XIAP pero no directamente, sino sirviendo de puente entre XIAP y la proteína E3 ligasa Siah-1, que ubiquitina a XIAP marcándola para degradación (Garrison, Correa et al. 2011). La degradación de XIAP es bloqueada por varias proteínas. Así, la interacción con HAX-1, AKT o el receptor de supervivencia Notch impide el marcaje mediante ubiquitinas de XIAP por diferentes mecanismos, como la fosforilación o el bloqueo de la unión de E2 ubiquitín ligasas (Dan, Sun et al. 2004; Liu, Hsiao et al. 2007; Kang,

Jang et al. 2010). También es inhibida por la proteína USP-19 que escinde las ubiquitinas ya unidas a XIAP (Mei, Hahn et al. 2011) y por la unión con la IAP Survivina que impide la entrada de XIAP al proteosoma (Dohi 2004). La actividad de XIAP puede inhibirse mediante su redistribución desde el citoplasma al núcleo mediada por la proteína XAF1. XAF1 (*XIAP-associated factor 1*) es una proteína nuclear proapoptótica que no degrada a XIAP, pero lo secuestra traslocándolo al núcleo, además de bloquear su unión a caspasas (Liston, Fong et al. 2001). Curiosamente, XAF-1 también promueve la apoptosis formando un complejo con XIAP y Survivina que causa la ubiquitinación y degradación de esta última (Arora, Cheung et al. 2007).

Además de la regulación de XIAP en las vías apoptóticas, su actividad en otras vías también está regulada. Destaca en este sentido, la regulación de su función en la vía de NF- κ B mediante la proteína SIVA1. La interacción de esta proteína con el dominio RING de XIAP desestabiliza el complejo XIAP-TAB1-TAK1 y evita así la subsecuente activación del complejo IKK necesario para el progreso de la vía (Resch, Schichl et al. 2009). Otros reguladores de XIAP junto con información adicional sobre la función de la interacción y sus consecuencias celulares se recogen en la tabla I3.

Proteína	Función interacción	Consecuencia	Referencias
TAB1	Formación de complejo XIAP-TAB1-TAK1 y activación de TAK1.	Aumento de señalización NFκB.	Lu, 2007; Galban, 2010
AKT	Fosforilación de XIAP en aa 87, aumentando su estabilidad.	Aumento de supervivencia.	Dan, 2004
XIAP	Dimerización XIAP, asociación con TAB1 y Ubiquitinación De TAK1.	Aumento señalización NF-κB.	Lu, 2007
AIF	Ubiquitinación de AIF.	Inhibición apoptosis caspasa independiente.	Wilkinson, 2008
Caspasa 3/7	Degradación proteosoma de Caspasa 3/7	Inhibición de apoptosis	Datta, 2000; Schile, 2008
RIPK2	Unión de XIAP al receptor NOD ½. Ubiquitinación deRIPK2.	Activación vía NF-κB	Krieg, 2009; Damgaard, 2012
Caspasa 9	Bloqueo procaspasa-9. Degradación proteosoma de la caspasa 9.	Inhibición de apoptosis	Zou, 2003; Morizane 2005
CCS	Ubiquitinación de CCS en Lys241. Activación de SOD1 por CCS.	Protección antioxidante de la célula.	Brady, 2010
COMMD1	Degradación de COMMD1, aumentando [Cu2+] en la célula.	Aumento de apoptosis.	Mufti, 2007
ART's	Inhibición de XIAP promoviendo su degradación.	Aumento de apoptosis.	Garrison, 2011; Bornstein, 2011
GSPT1/eRF3	Inhibición de XIAP.	Aumento de apoptosis.	Hedge, 2003
Cadenas de ubiquitinas Lys63	Ubiquitinación de proteínas en Lys 63, Ej: IKKγ/NEMO.	Aumento de supervivencia. Ej: Activa vía NF-κB	Gryd-Hansen, 2008
MEKK2	Ubiquitinación en K48 y K63 de MEKK2.	Activación vía NFκB	Winsauer, 2008
SIVA1	Bloqueo en la formación de complejo XIAP-TAB1-TAK1.	Activación apoptosis vía JNK, inhibición señalización NF-κB	Resch, 2009
NO	Transnitrosilación de XIAP. Bloqueo de su actividad E3 ligasa.	Aumento de apoptosis	Nakamura, 2010
NRAGE	Formación complejo XIAP-TAB1-TAK1, Fosforilación p38 y activación caspasa 3.	Activación de vías JNK, p38-MAPK apoptosis y NF-κB.	Jordan, 2001; Rochira, 2011
Receptor BMP tipo 1	Incorporación de TAB1 al receptor BMP.	Activación señal TAB1-TAK1	Yamaguchi, 1999
Notch	Bloqueo de la ubiquitinación de XIAP, aumentando su estabilidad.	Aumento de supervivencia	Liu, 2007

3.5 LA PROTEÍNA REGULADORA FAF1

Los trabajos sobre la proteína XIAP de nuestro laboratorio han incluido la búsqueda de nuevas interacciones que contribuyan a regular la apoptosis, ya sea modulando las diferentes vías o la propia actividad de XIAP. Con este fin, desarrollamos estudios de dos híbridos usando como cebo a un mutante de la proteína XIAP carente del dominio RING (mutante XIAP- Δ RING) y como presa un librería de proteínas. Este ensayo identificó a la proteína pro-apoptótica FAF1 (*Fas Associated Factor 1*) como una potencial proteínas de unión a XIAP.

FAF1 fue subclonada y descrita por primera vez en 1995 como un factor proapoptótico de unión a la región citoplasmática del receptor Fas/CD95 (Chu, Niu et al. 1995). En 1999 se describió el factor FAF1 humano, altamente expresado en músculo esquelético, corazón y testículo (Ryu, Chae et al. 1999). FAF1 esta formado por 650 aminoácidos, con un peso molecular de 74 kDa. También presenta una forma corta de 49 KDa que mantiene su capacidad de unión al receptor FAS (Adham, Khulan et al. 2008). FAF1 está presente en diferentes localizaciones subcelulares, desde el citoplasma a la zona perinuclear o el núcleo, dependiendo del tipo celular estudiado (figura I11) (Frohlich, Risau et al. 1998; Jensen, Hjerrild et al. 2001; Ryu, Lee et al. 2003). Su localización parece estar determinada por la fosforilación de sus serinas en posición 289 y 291, que favorecen su entrada al núcleo (Frohlich, Risau et al. 1998; Olsen, Jessen et al. 2003).

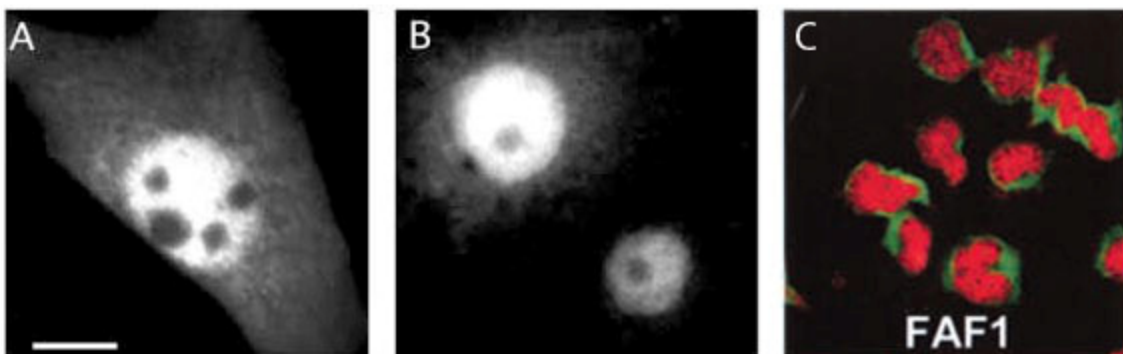


Figura I11. Localización de FAF1. A y B: FAF1 fue sobreexpresado transitoriamente en fibroblastos NIH 3T3 y COS, mostrando localización nuclear y citoplasmática (Frohlich, Risau et al. 1998). C: Localización FAF1 endógeno en el citoplasma de células Jurkat. En verde se muestra la señal de FAF1 y en rojo la tinción del núcleo (Ryu, Lee et al. 2003).

3.5.1 Estructura y función

La estructura de FAF1 incluye múltiples dominios funcionales (figura I12). En su extremo N-terminal presenta un dominio FID (*Fas Interacting Domain*) que incluye además un dominio UBA (*Ubiquitin Associated domain*) y un dominio homólogo a ubiquitina (UB1). Posee también un dominio DEDID (*Death Effector Domain-Interacting Domain*), que a su vez incluye otro dominio homólogo de ubiquitina (UB2), un dominio de localización nuclear NLS (*Nuclear Localization Signal*) y un dominio de asociación a ubiquitina (UAS). Cerca del extremo C-terminal contienen un dominio CAF (*Cromatin Associated Factor*) y un dominio regulador de ubiquitinas UBX (Frohlich, Risau et al. 1998; Ryu, Chae et al. 1999; Menges, Altomare et al. 2009; Lee, Park et al. 2013). Esta variedad de dominios estructurales de unión a diferentes proteínas permiten a FAF1 participar en múltiples procesos celulares, incluyendo la degradación de proteínas a través de proteosoma, apoptosis, ciclo celular, transmisión neuronal y muerte celular.

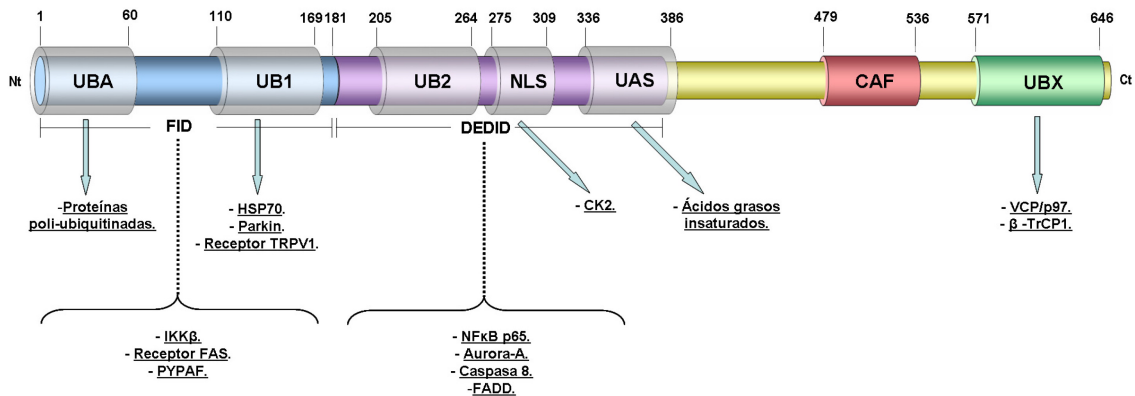


Figura I12. Esquema de los dominios e interacciones de la proteína FAF1. En la parte superior se muestran los aminoácidos que comprenden los dominios de la proteína FAF1. Bajo cada dominio o conjunto de ellos, se muestra una relación de proteínas que interactúan con dicho dominio. Nt y Ct indican los extremos N terminal y C terminal de la cadena de aminoácidos.

La primera función celular que se asoció con FAF1 fue su acción proapoptótica en la muerte iniciada por el receptor Fas/CD95 (Chu, Niu et al. 1995). Los resultados de este estudio demostraron que FAF1 se une a la proteína adaptadora FADD y a la caspasa 8 a través de su dominio DEDID (*Death Effector Domain – Interacting Domain*) para formar parte del complejo de inducción de señalización de muerte (DISC). Su integración en el DISC contribuye a estabilizar el complejo y favorece la

transmisión de la señal apoptótica. FAF1 también induce la muerte celular por otras vías, sensibilizando las células frente a inductores farmacológicos de muerte como Staurosporina, Cisplatino o Etopóxido. Este efecto es debido a la participación de sus dominios DEDID en la formación de los Filamentos Efectores de Muerte (*Death Effector Filaments* - DEFs), una estructura del citoesqueleto encontrada en procesos de apoptosis independientes de receptores de muerte (Park, Ryu et al. 2005). Este mecanismo podría ser responsable de las observaciones de Riu y Kim (Ryu and Kim 2001), que describieron que la sobreexpresión de FAF1 o de su dominio DEDID aislado es capaz de iniciar el proceso apoptótico y activar la caspasa 3 en células humanas BOSC23 en ausencia de estímulos externos.

FAF1 también participa en el proceso de degradación de proteínas ubiquitinadas en el proteosoma (Buchberger 2002). Esta actividad está mediada por dos mecanismos relacionados dependientes de sus dominios UBA y UBX. Por un lado, recluta proteínas poliubiquitinadas a través de su dominio UBA N-terminal y favorece la acumulación de proteínas poliubiquitinadas bloqueando su entrada al proteosoma, situación que sensibiliza a las células a la muerte celular (Song, Yim et al. 2005). Sin embargo, esta interacción también puede desembocar en la degradación de las proteínas poliubiquitinadas como se ha descrito con la proteína HSP-70 (Lee, Kim et al. 2012). La degradación de esta chaperona que regula el correcto plegamiento de las proteínas e inhibe la formación del apoptosoma, facilita la activación de la caspasa 9 (Saleh, Srinivasula et al. 2000) y la acumulación de proteínas defectuosas que pueden activar la vía de muerte celular de JNK/SAPK (Kim, Song et al. 2005). Por otro lado, FAF1 actúa como cofactor de la proteína VCP/Cdc48/p97 (*Valosin-containing protein*) a través de su dominio C-terminal UBX (Song, Yim et al. 2005). La proteína VCP, perteneciente a la familia AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*), tiene como función extraer proteínas poliubiquitinadas de complejos multiproteicos y de las membranas lipídicas para su degradación en el proteosoma (función ubiquitin-segregasa) (Schuberth and Buchberger 2008). La unión de FAF1 favorece el reclutamiento de proteínas poliubiquitinadas unidas al dominio UBA de FAF1 al complejo de VCP (Lee, Park et al. 2013). Este mecanismo participa en la fase final de la degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD), contribuyendo a reclutar y trasladar las proteínas mal plegadas desde la membrana del retículo hasta el proteosoma (Lee, Park et al. 2013). Además de estas funciones, FAF1 también participa en la

poliubiquitinación y degradación de β -catenina, actuando como andamiaje de unión de β -catenina y la E3 ubiquitín ligasa β TrCP del complejo de ubiquitinación SCF (Skp1/Cul1/F-box) e inhibiendo la vía de Wnt/ β -catenina (Zhang, Zhou et al. 2011; Zhang, Zhou et al. 2012).

FAF1 también contribuye a la muerte celular a través de la regulación de la vía de supervivencia celular de NF- κ B, interfiriendo a varios niveles en su vía canónica. En primer lugar, se une mediante su dominio FID a la quinasa IKK β (*Inhibitor of NF- κ B Kinase subunit beta*), bloqueando su actividad y desestabilizando el complejo IKK $\alpha/\beta/\gamma$ (Park, Moon et al. 2007). Como consecuencia, no se produce degradación de I κ B α (*Inhibitor of NF- κ B*) que mantiene secuestrado a NF- κ B en el citoplasma. En niveles posteriores de la vía, FAF1 se une a RelA/p65 mediante su dominio DEDID, bloqueando la entrada al núcleo de esta subunidad de NF- κ B y evitando así su actividad sobre la transcripción (Park, Jang et al. 2004). Adicionalmente, FAF1 también puede bloquear esta vía a través de su interacción con proteínas asociadas a procesos inflamatorios, como las PYPAFs (*PYRIN-containing Apaf1-like Proteins*), que activan la vía NF- κ B y el procesamiento de citoquinas (Kinoshita, Kondoh et al. 2006).

FAF1 también está implicada en la regulación del ciclo celular, principalmente mediante su interacción con la Aurora-A, una quinasa fundamental para los procesos de mitosis y meiosis. Su interacción a través del dominio DEDID causa la degradación proteosomal independiente de ubiquitina de Aurora-A. Además esta interacción causa la fosforilación de FAF1 en las serinas 289 y 291, asociada a una regulación negativa de la progresión del ciclo celular en G2/M (Jang, Sul et al. 2008). La fosforilación de FAF1 se produce en el dominio de señal de localización nuclear (NLS) y podría favorecer el desplazamiento al núcleo de FAF1, como se observó en la interacción de FAF1 con el regulador del ciclo celular y reparación del ADN Caseína quinasa 2 (CK2) (Guerra, Boldyreff et al. 2001). La presencia de un dominio de homología a la subunidad p150 del factor de unión a cromatina (CAF) en FAF1 podría conferir a FAF1 diversas funciones en el núcleo (Ryu, Chae et al. 1999).

Toda esta diversidad de funciones confiere a FAF1 un importante papel en numerosos procesos biológicos, tanto en el desarrollo normal y el funcionamiento del sistema nervioso, como en múltiples patologías. FAF1 resulta esencial para el desarrollo

embrionario, como demuestra que su silenciamiento en ratones transgénicos conduce a la muerte en estadios tempranos (Adham, Khulan et al. 2008). Posteriormente tiene un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, particularmente en la regulación de la apoptosis durante el desarrollo del cerebro, asociado a niveles de expresión espacial y temporalmente regulados en el cerebro de ratón durante su desarrollo (De Zio, Ferraro et al. 2008). Además de sus efectos pro-apoptóticos, FAF1 también contribuye a otros aspectos del desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, como ilustran los estudios de Cheng y colaboradores (Cheng, Bai et al. 2011) que mostraron que la sobreexpresión de FAF1 en el desarrollo post-natal del bulbo olfatorio de ratones provoca una orientación aberrante de los axones neuronales. Asimismo, y ya en el sistema nervioso adulto, FAF1 modula la sensibilidad frente a estímulos nocivos en neuronas sensoriales, interaccionando con el receptor de capsaicina TRPV1 a través del dominio UB1 (Kim, Kang et al. 2006).

En el ámbito de la patología, FAF1 es fundamentalmente conocido en oncología como una proteína supresora de tumores (Menges, Altomare et al. 2009). Esto se debe a que la pérdida de función o la baja expresión de FAF1 está asociada con procesos oncogénicos, como en el caso de carcinomas gástricos humanos (Bjorling-Poulsen, Seitz et al. 2003). De igual forma, se ha observado la delección del locus FAF1 es característica del Linfoma de las Células de Manto de los nódulos linfáticos (*Mantle Cell Lymphoma*) (Bea, Salaverria et al. 2009) y está presente en un 30% de los carcinomas de cervix de útero (Hidalgo, Baudis et al. 2005).

Además de su importancia en los procesos tumorales, los cambios de expresión o actividad FAF1 también participan en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Wang, Zhang et al. 2003) o la enfermedad de Parkinson (Betarbet, Anderson et al. 2008). Recientemente se ha descrito el mecanismo de actividad de FAF1 en la enfermedad de Parkinson. En condiciones no patológicas la proteína parkin interacciona con el dominio UB1 de FAF1 uniéndole ubiquitininas por su actividad E3 ubiquitin ligasa, marcándole para su degradación (Sul, Park et al. 2013). Por tanto, la mutación del gen de parkin asociada a varias formas de la enfermedad de Parkinson reducirá o eliminará su actividad sobre FAF1 que aumenta sus niveles pudiendo contribuir a la muerte apoptótica de células neurales.

Proteína	Función interacción	Consecuencia	Referencias
HSP70	Degradación de HSP70.	Aumento de apoptosis.	2005, Kim
Parkin	Ubiquitinación de FAF1.	Prevención de Enfermedad de Parkinson.	2013, Sul
Receptor TRPV1	Reducción sensibilidad del receptor.	Menor respuesta a dolor inflamatorio en neuronas sensoriales.	2006, Kim
Proteínas poliubiquitinadas en Lys48 y Lys63	Reclutamiento al complejo VCP. Regulación de su degradación o señalización.	Promoción apoptosis.	2005, Song 2013, Lee
IKK β	Destabilización y bloqueo del complejo IKK.	Bloqueo de señalización NF- κ B.	2007, Park
Receptor FAS	Estabilización complejo DISC	Promoción de la apoptosis.	1999, Ryu
PYPAF1,2,3 y7	Bloqueo de activación de NF- κ B a través de PYPAF's	Inhibición inflamación/supervivencia.	2006, Kinoshita
P65 Subunidad de NF- κ B	Bloqueo de entrada de p65 al núcleo.	Inhibición inflamación/supervivencia.	2004, Park
Aurora-A	Fosforilación serinas 289 y 291 de FAF1 y degradación proteosomal de Aurora-A.	Inhibición del ciclo celular.	2008, Jang
FADD	Estabilización complejo DISC	Aumento de apoptosis.	2003, Ryu
Caspasa 8	Estabilización complejo DISC	Aumento de apoptosis.	2003, Ryu
CK2	Fosforilación de serinas 289 y 291 de FAF1	Desplazamiento de FAF1 al núcleo	2003, Olsen.
Ácidos grasos insaturados de cadena larga	Polimerización FAF1	?	2013, Kim
VCP/p97	Estabilización de sustratos poliubiquitinados para su procesamiento.	Degradación proteosomal de proteínas poliubiquitinadas.	2008, Schubert; 2005, Song; 2013, Lee
β Catenina.	Aumento de poliubiquitinación y degradación de β Catenina.	Bloqueo de señalización Wnt	2011, Zhang
β -TrCP1	Andamiaje de unión del complejo SCF- β – TrCP, para degradación de β catenina	Bloqueo de señalización Wnt	2012, Zhang
Receptor de Mineralocorticoide MR y receptor de glucocorticoide GR	Modulación actividad transcripcional de MR y GR. Coactivación de MR.		2004, Obradovic

Tabla 13. Resumen de proteínas que interaccionan con la proteína FAF1. En las columnas se indica junto con la proteína que interacciona con FAF1, información de la función directa de la interacción producida y la consecuencia indirecta de dicha interacción. Se indican además los artículos mas relevantes que describen cada interacción.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio consiste en el estudio de reguladores de la muerte celular programada. Entre los reguladores descritos hasta la fecha, la proteína inhibidora de la apoptosis XIAP destaca por su capacidad de interacción y bloqueo de diversas caspasas. Esta actividad así como sus interacciones con factores pro-apoptóticos permiten a XIAP modular la apoptosis y otras vías de supervivencia. Dada la importancia de la precisa modulación de la muerte celular programada, el efecto citoprotector de XIAP está fuertemente regulado mediante su interacción con múltiples proteínas. La identificación y caracterización de nuevas interacciones de XIAP permitirá comprender su papel en la muerte celular programada y su regulación. Este conocimiento puede ser fundamental para comprender los procesos que subyacen a numerosas patologías asociadas a alteraciones de la muerte celular programada (tanto por exceso como por defecto) y la identificación de posibles dianas terapéuticas para su tratamiento.

En el proceso de identificación de nuevas interacciones de XIAP, nuestro laboratorio identificó la proteína FAF1 como candidata en un cribado de dos híbridos en levadura. Esta proteína es particularmente interesante porque, entre sus diversas funciones, contribuye a la señalización apoptótica de la vía Fas/CD95 así como a la modulación de la vía de señalización de NF- κ B, dos vías también reguladas por XIAP. En base a estos resultados y a la información bibliográfica existente, hipotetizamos que ambas proteínas interactúan y que esta interacción modula su actividad en las vías de apoptosis y NF- κ B.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es contrastar estas hipótesis, concretamente:

1. Verificar la interacción entre XIAP y FAF1, particularmente en células humanas.
2. Caracterizar la interacción, definiendo las regiones mínimas de interacción entre ambas proteínas.
3. Comprobar que la distribución de las proteínas en la célula permite su interacción en condiciones fisiológicas y bajo estimulación apoptótica.

4. Analizar la implicación funcional de la interacción XIAP-FAF1 en la muerte celular, particularmente en la mediada por la vía extrínseca de Fas/CD95.
5. Analizar la implicación funcional de la interacción en la señalización de la vía NF- κ B mediada por el receptor TNFR1.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos generales

Adquirimos los siguientes reactivos en **Sigma-Aldrich, MO, EEUU:**

2-mercaptoetanol (M7154), 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT; A8056), Acetato de Sodio (NaAc; 241245), Acrilamida/bis_acrilamida 40% (A7168), Albúmina de suero bovino (BSA; A7906), Ampicilina (A93939), Azul de bromofenol (114391), desoxicolato sódico (DOC; D6750), 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS; 226947), Digitonina (D141), DL-Ditiotreitol (DTT; 43815), Dodecil sulfato sódico (SDS; L4509), estaurosporina (S4400), Kannamicina (60615), Bromuro de Etidio (E1510), Fluoruro sódico (S7920), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; P7626), Glicerol (G7893), Nonidet P-40 (Igepal CA-630; I3021), N-Etilmaleimida (NEM; E3876), Ortovanadato sódico (S6508), Orto-nitrofenil- β -galactosido (ONPG; N1127), Polietilenglicol sorbitan monolaurato (TWEEN[®] 20; P1379), Persulfato amónico (Z3678), Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base; T1503), N,N,N',N'-tetrametiletanol-1,2-diamina (TEMED; T9281) y Tritón X-100 (T8787)

Adquirimos los siguientes reactivos en **Affymetrix-USB, CA, EEUU:**

Ácido bórico (76324), Agarosa (32802), Glicerol (16374), Cloruro potásico 2M (KCl; 75896), Cloruro magnésico 1M (MgCl₂; 75887), Etilen-diamino-tetracético 0.5M pH 8.0 (EDTA; 15694), Etilen glicol de ácido tetracético (EGTA; 15703), Cloruro cálcico (CaCl₂; 12531), LB Agar (75851), LB Broth (75852).

Adquirimos los siguientes reactivos en **Merck, NY, EEUU:**

2-isopropanol (K37993034.750), Ácido clorhídrico 1N (HCl; HC817952), Cloruro sódico (NaCl; K39301104.842), Etanol (02860), Metanol (322415) y Sacarosa (1076871000)

Además de los reactivos mencionados, utilizamos otros más específicos cuya procedencia se indica en el texto.

5.2 Anticuerpos

Los anticuerpos que utilizamos en los experimentos desarrollados en esta Tesis se describen en la siguiente tabla:

Anti-	Origen	Tipo	Casa comercial	Código
Caspasa 3	Conejo	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	9662
Caspasa 3 activa	Conejo	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	9661
Caspasa 7	Conejo	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	9492
Caspasa 8	Ratón	monoclonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	9746
Caspasa 9	Ratón	monoclonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	9508
CD95/Fas	Ratón	monoclonal	EMDMillipore, Alemania	05-201
c-myc	Ratón	monoclonal	Roche, Suiza	11667149001
EGFP	Ratón	monoclonal	Roche, Suiza	11 814 460 001
FAF1	Conejo	monoclonal	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab183045
FAF1	Conejo	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	4932
HA	Ratón	monoclonal	Roche, Suiza	12CA5
HA	Conejo	policlonal	Roche, Suiza	H6908
IgG conejo HPC	Cabra	policlonal	Pierce Biotechnology, IL, EEUU	31460
IgG conejo-Alexa 594	Cabra	policlonal	Molecular Probes. CA, EEUU	A-11012
IgG ratón HPC	Cabra	policlonal	Pierce Biotechnology, IL, EEUU	31430
IgG ratón-Alexa 488	Cabra	policlonal	Molecular Probes. CA, EEUU	A-11029
Isotipo control IgG	Ratón	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	ab37355
NF-κB p65	Conejo	monoclonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	4764
PARP	Ratón	monoclonal	BD Bioscience, NJ, EEUU	556494
Tab-1	Conejo	monoclonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	3226
XIAP	Conejo	policlonal	Cell Signalling Technology, MA, EEUU	2042
XIAP	Ratón	monoclonal	BD Bioscience, NJ, USA	610717
XIAP	Ratón	monoclonal	Abnova, Taipei, Taiwán	H00000331-M04
β-actina	Ratón	monoclonal	Sigma-Aldrich, MO, USA	A5441
β-tubulina	Ratón	monoclonal	Sigma-Aldrich, MO, USA	T 5293

Tabla M1. Listado de anticuerpos utilizados. Se indica en las diferentes columnas la proteína reconocida por el anticuerpo, la especie animal en la que se ha generado, el tipo de anticuerpo, la casa comercial y el número de catálogo.

5.3 Cultivos celulares y preparación de muestras

5.3.1 Líneas celulares:

Cultivamos todas las líneas celulares a una temperatura constante de 37°C, una presión de oxígeno de 5% y una humedad relativa del 95%, en el incubador NU-5500 Direct Heat Autoflow (NuAire, Plymouth, MN, USA). Utilizamos las líneas celulares

para todos los experimentos entre los pases 0 y 20, manteniendo el subcultivo hasta una confluencia aproximada del 85%. Calculamos la densidad celular mediante cámara de Neubauer.

Para realizar subcultivos despegamos las células de su soporte inhibiendo sus mecanismos de adhesión. Primero lavamos con tampón fosfato salino (PBS; 17-516F; BioWhittaker Lonza, Suiza) e incubando durante 5 minutos con tripsina-EDTA (17-161E; BioWhittaker Lonza, Suiza) a 37°C. Paramos la acción de la enzima añadiendo medio de cultivo con FBS y recogimos las células en tubos estériles. Centrifugamos las células durante 3 minutos a 200xg y las resuspendimos en el medio de cultivo adecuado. Por último, sembramos las células a una confluencia del 15% aproximadamente. Los soportes que utilizamos para el crecimiento de las células fueron placas NUNC (ThermoFisher scientific, MA, EEUU) de diferentes diámetros y configuraciones que se comentaran para cada experimento. Se controló la contaminación por micoplasma mediante el kit comercial Mycoalert (LT07-218; Lonza, Suiza).

Las líneas celulares utilizadas fueron:

- HEK 293T/17 (ATCC: CRL-11268): Fibroblastos de hígado embrionario humano, se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 12-604-F; BioWhittaker Lonza, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; 10270-098; Gibco ThermoFisher Scientific, MA, EEUU), 1% L-Glutamina (Gln, 17-605C; BioWhittaker Lonza, Suiza) y 1% penicilina/estreptomicina (Penicilina 10000 Unidades/ml y estreptomicina 10000 µg/ml; 17-602F; BioWhittaker Lonza, Suiza).

- Neuro-2a (ATCC: CCL-131): Neuroblastoma de cerebro de ratón, cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS 1% L-Gln y 1% Pen/Strp.

- HeLa (ATTC: CCL-2): Adenocarcinoma humano de cervix, cultivadas en medio Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; 12-611F; BioWhittaker Lonza, Suiza), suplementado con 10% de FBS, 1% L-Gln, 1% Piruvato 100mM (13-115E; BioWhittaker Lonza, Suiza), 1% de Aminoácidos no esenciales 10 mM (13-114E; BioWhittaker Lonza, Suiza) y 1% Pen/Strp.

- SH-SY5Y (ATCC: CRL-2266): Neuroblastoma humano de médula ósea, cultivadas en medio EMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% L-Gln, 1% Piruvato, 1% de Aminoácidos no esenciales y 1% Pen/Strp.

- U373 MG (ATCC: HTB-17): Glioma astrocitoma humano de cerebro, cultivadas en medio EMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% L-Gln, 1% Piruvato, 1% de Aminoácidos no esenciales y 1% Pen/Strp.

- T98G (ATCC: CRL-1690): Glioma multiforme de cerebro humano, cultivadas en medio EMEM, suplementado con 10% de FBS, 1% L-Gln, 1% Piruvato, 1% de Aminoácidos no esenciales y 1% Pen/Strp.

5.3.2 Obtención de extractos celulares

- Protocolo general de lisis celular: Tampón de lisis compuesto por: 50mM HEPES (BE17-737E; Lonza, Suiza), 150mM NaCl, 0.5% Nonidet P40 y 1x de un cóctel de inhibidores de proteasas (11873580001; Roche, Suiza). Levantamos las células con tripsina y recogimos las células en tubos estériles. Centrifugamos 3 minutos a 200xg y resuspendimos las células en 200-500 µl de tampón de lisis. Incubamos a 4°C durante 15 minutos y centrifugamos a 13500xg durante 3 minutos. Recogimos el sobrenadante

- Tampón de lisis para el ensayo de caspasas: Tampón compuesto por: 25 mM HEPES, 150 mM NaCl 0.1% Nonidet P-40, 1% DOC, 10% glicerol, 10 mM MgCl₂, 2 mM CHAPS, 0.1% SDS, 2mM EDTA, 1mM ortovanadato, 25 mM NaF, y 1x cóctel de inhibidores de proteasas.

Levantamos las células de la placa de cultivo con tripsina y incubamos 30 minutos a 4°C en rotación. Seguidamente realizamos una sonicación de las muestras durante 10 segundos, 2 ciclos, al 50% (Sonoplus, Bandelin electronics. Berlín, Alemania). Finalmente, centrifugamos las muestras a 3300g, 15 minutos a 4°C y recogimos el sobrenadante.

- Separación extracto nuclear y citosólico: Lavamos las células 2 veces con PBS y situamos las placas de cultivo sobre hielo. Añadimos 1 ml de PBS con EDTA 1mM a 4°C. Levantamos las células con un raspador celular muy suavemente y transferimos las células a tubos estériles de 1.5 ml. Centrifugamos a 3400xg durante 5 minutos a 4°C y descartamos el sobrenadante. Resuspendimos en 500 µl de tampón A (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,5M Sacarosa, 0,1mM EDTA, 0,5% Tritón X100, 1mM DTT, 100mM NaF y 1x del cóctel de inhibidores de proteasas). Tras una incubación de 5 minutos en hielo, centrifugamos a 200xg en centrífuga de rotor bascular durante 10 minutos. Separamos en dos tubos sedimento y sobrenadante. El sobrenadante lo centrifugamos a 18000xg durante 15 minutos y el nuevo sobrenadante contiene la fracción

citoplasmática. El sedimento lo resuspendemos 500 μ l de tampón B (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1 mM EGTA 1 mM DTT y 1x del cóctel de inhibidores de proteasas) y centrifugamos a 250xg durante 5 minutos. Descartamos el sobrenadante y añadimos 100 μ l de tampón C (10mM HEPES pH 7,9, 500mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 0,1% Nonidet P40, 1mM DTT y 1x del cóctel de inhibidores de proteasas). Agitamos en vortex durante 15 minutos a 4°C a alta velocidad y centrifugamos a 18000xg durante 10 minutos a 4°C. Recogimos el sobrenadante, obteniendo la fracción nuclear.

- Ensayo de Ubiquitinación: Recogimos las células de la placa de cultivo de la misma manera que con el tampón de lisis general y añadimos 500 μ l de tampón (tampón RIPA (R0278; Sigma-Aldrich, MO, EEUU), 2mM NEM y 1x del cóctel de inhibidores de proteasas). Incubamos 15 minutos a 4°C y centrifugamos a 13500xg durante 3 minutos a 4°C. Recogimos el sobrenadante. El compuesto NEM es un inhibidor de deubiquitininas, permitiendo mantener íntegras las cadenas de ubiquitina unida a proteínas para poder ser detectadas.

5.3.3 Plásmidos y vectores de expresión

XIAP y todos sus mutantes truncados: XIAP- Δ RING, XIAP- Δ (BIR3-RING), XIAP- Δ (BIR1-BIR2) fueron unidos al dominio GAL4-BD (de unión a ADN), y subclonados en el vector de expresión para levaduras pGBKT7. La proteína FAF1 unida al dominio GAL4-AD se subclonó en el vector de expresión en levaduras pGADT7. La proteína XIAP fue subclonada en el vector de expresión en bacterias pGEX-4T3. La proteína FAF1 fue subclonada en el vector de expresión en células de mamíferos pEGFP-C1. Todas las construcciones indicadas hasta el momento en este apartado fueron amablemente cedidas por el Dr. Lindholm (Universidad de Uppsala, Suecia). Las construcciones del promotor de NF- κ B con el gen reportero de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), pcDNA3.1-promotor NF- κ B-*luc* y el vector control con el gen reportero de luciferasa de pólipos marinos (*Renilla reniformis*), pcDNA3.1-*rluc* fueron amablemente cedidos por el Dr. José Alcamí (CSIC, Madrid). La proteína de fusión Ubiquitina-His en el vector de expresión en eucariotas pMT107 fue amablemente cedida por el Dr. Dirk Bohmann (Universidad de Rochester, NY, EEUU).

En nuestro laboratorio generamos los demás plásmidos mediante técnicas de corte y ligación de plásmidos, utilizando el vector de expresión pcDNA3.1 de expresión en mamíferos (Invitrogen, CA, EEUU) Para el primer corte, disolvimos tanto el vector pcDNA3.1 como el ADN para subclonar (inserto) en agua pura a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, a la que añadimos 10% de tampón específico de cada enzima de restricción (Fermentas, actualmente parte de Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) y 5% de enzima de resticción deseada (Fermentas, actualmente parte de Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) en un volumen total de 50 μl e incubamos a 37°C durante una hora y media. Antes de realizar el segundo corte, añadimos $1/10$ volúmenes de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol a una temperatura de -20°C. Centrifugamos 10 minutos a máxima velocidad a 4°C. Lavamos con etanol 70% y dejamos secar a 37°C. Para el segundo corte resuspendimos en un volumen total de 50 μl compuesto por 10% de tampón específico de la enzima de restricción utilizada, 5% de enzima de restricción y agua pura e incubamos durante una hora y media. Para la extracción, añadimos a la disolución 10% de tampón de carga (250 mg/ml Bromofenol, 49,5 mM Tris pH 7,6, 60% Glicerol y agua) y lo resolvimos en un gel de 0.8% de agarosa con Bromuro de Etidio 1:10000, para la detección del ADN bajo luz ultravioleta. El gel se dispuso en tampón TBE 0.5X (Tris 0.1M-Borato 0.1M-EDTA 2mM) y utilizamos una corriente continua de 100V para la electroforesis. Utilizamos el marcador de pesos moleculares de DNA (FastDigest gene ladder; SM1553; Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) junto con las muestras. Detectamos el ADN mediante lámpara ultravioleta (Gel Logia 1500 Image System; Kodak, NY, EEUU). Extrajimos el ADN del gel mediante un kit de extracción (QIAquick; 28704; QIAgen, Limburg, Holanda). Para la ligación, añadimos el vector y el inserto en proporciones 1:3 en buffer T₄ligasa (Fermentas, actualmente parte de Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) y 10% de la enzima T₄ ADN ₄Ligasa (Fermentas, actualmente parte de Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) en un volumen total de 20 μl e incubamos a 16°C toda la noche.

Mediante la técnica descrita, subclonamos en el vector de expresión pcDNA3.1 la proteína XIAP y todos sus mutantes unidos al marcador molecular c-myc: c-myc-XIAP, c-myc-XIAP- Δ RING, c-myc-XIAP- Δ (BIR3-RING), c-myc-XIAP- Δ (BIR1-BIR2), así como la proteína de fusión HA-FAF1 y sus mutantes de delección HA-FAF1-FID, HA-FAF1- Δ CtDEDID y HA-FAF1- Δ NtDEDID. (Ver tabla M2).

Transformamos células bacterianas competentes BL-21 (B2685, Sigma-Aldrich, MO, EEUU) con las construcciones generadas. Añadimos las construcciones a los viales de células competentes descongelados previamente durante 30 minutos. Incubamos en hielo durante 30 minutos y dimos un choque térmico de 42°C durante 45 segundos, volviendo a colocar los viales en hielo. Añadimos LB e incubamos 1 hora a 37°C en agitación fuerte. Centrifugamos 2 minutos a 3000g y desechamos el 80% del sobrenadante. Resuspendimos las células y las sembramos en placas con LB agar con ampicilina 50 µg/ml o kannamicina 10 µg/ml según la resistencia presente en el plásmido generado. Mantenemos las placas sembradas a 37°C durante 24 horas. Seleccionamos una colonia de bacterias aisladas y con una punta de pipeta la extrajimos del Agar y la introducimos en un tubo estéril con 2 ml de LB con ampicilina 50 µg/ml o kannamicina 10 µg/ml según la resistencia de selección del plásmido, y incubamos a 37°C con agitación durante 24°C. Transferimos 500 µl a un tubo nuevo y añadimos 500 µl de glicerol, para almacenarlo a -80°C. Para el crecimiento y purificación de los plásmidos congelados, inoculamos una porción del stock bacteriano en 250 ml de LB con ampicilina 50 µg/ml o kannamicina 10 µg/ml y realizamos el crecimiento de las bacterias cultivando en agitación a 37°C durante 18 horas. Realizamos la purificación de los plásmidos mediante el kit comercial Endofree Plasmid Maxi kit (Quiagen, Limburg, Holanda). Evaluamos la pureza, mediante la proporción entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, y concentración en el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop Technologies, actualmente parte de ThermoFisher Scientific, MA, EEUU).

Un resumen de los plásmidos utilizados en esta Tesis se describe en la siguiente tabla:

Proteína expresada	Vector de expresión	Origen
-----	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	kit comercial
-----	pCL-1 (Clontech, Palo Alto, CA)	kit comercial
AD-cDNA de cerebro fetal humano	pACT2 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
AD-FAF1	pGADT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
BD	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	kit comercial
BD-Lam	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	kit comercial
BD-XIAP	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
BD-XIAP-Δ(BIR1-BIR2)	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
BD-XIAP-Δ(BIR3-RING)	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
BD-XIAP-ΔRING	pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
c-myc-XIAP	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
c-myc-XIAP-Δ(BIR1-BIR2)	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
c-myc-XIAP-Δ(BIR3-RING),	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
c-myc-XIAP-ΔRING	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
EGFP	pEGFP-C1(Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
FAF1-EGFP	pEGFP-C1(Clontech, Palo Alto, CA)	Dr. Lindholm
GST	pGEX-4T3 (GE Healthcare, WI, USA)	Dr. Lindholm
GST-XIAP	pGEX-4T3 (GE Healthcare, WI, USA)	Dr. Lindholm
HA-FAF1	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
HA-FAF1-FID	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
HA-FAF1-ΔCtDEDID	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
HA-FAF1-ΔNtDEDID	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	propio
Promotor NF-κB- <i>luc</i>	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	Dr José Alcamí
<i>rluc</i>	pcDNA3.1 (Invitrogen, CA, USA)	Dr José Alcamí
Ubiquitina-His	pBSSK	Dr. Dirk Bohmann

Tabla M2. Listado de plásmidos utilizados. Se indica en las diferentes columnas la proteína expresada por el plásmido, el vector de expresión y el origen de las construcciones.

5.3.4 Método de transfección

Realizamos la transfección con el reactivo Transfectin (1703351; Bio-Rad CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, sembramos las células en medio de crecimiento durante 24 horas o hasta una confluencia de entre 50 y 70%, dependiendo de la velocidad de crecimiento del cultivo o de si las células iban a ser tratadas o no con estímulo pro-apoptótico posteriormente. Para una placa P100 (100mm de diámetro y una superficie de 56,7 cm²), diluimos 15 μl del reactivo Transfectin en 1,5 ml de medio de cultivo sin suero. Incubamos la mezcla durante 20 minutos para la formación de los lipocomplejos a temperatura ambiente. Mientras tanto en otro tubo añadido 1,5 ml de medio de cultivo sin suero y diluyo 15 μg de ADN. Pasados los 20 minutos, mezclamos las dos preparaciones e incubamos 5 minutos. Preparamos a las células, poniendo 10 ml de medio nuevo suplementado a las células y les añadimos la

mezcla lentamente, mientras agitamos la placa. Incubamos durante 4 horas a 37°C en el incubador. Pasado este tiempo, cambiamos el medio de cultivo e incubamos las células 24-36 horas.

5.4 Ensayo de interacción XIAP-FAF1 en levaduras

Para comprobar la interacción entre XIAP y el gen seleccionado e identificado (FAF1) preparamos plásmidos de expresión para levaduras de las proteínas de fusión XIAP-BD (plásmido pGBKT7) y FAF1-AD (plásmido pADT7), y utilizamos como controles: el plásmido pCL-1 que contiene la secuencia completa de GAL4, el plásmido pGBKT7 (BD-vector), el plásmido pADT7 (AD-vector) y Lam-BD como control de interacción inespecífico (dominio BD fusionado con la proteína Laminina C incorporado en el plásmido pGBKT7). Cotransformamos la cepa de levadura AH109 con los plásmidos: pCL-1 solo, XIAP-BD y AD-vector, BD-vector y FAF1-AD, Lam-BD y FAF1-AD y finalmente XIAP-BD y FAF1-AD. Crecimos todas las colonias en medio selectivo, compuesto por medio mínimo (SD) con ausencia de aminoácidos esenciales (leucina, triptófano, histidina y adenina) y suplementado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido (X- α -Gal.) y 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol), y también en medios menos restrictivos (sin leucina, sin triptófano o sin leucina ni triptófano) como control. Solo las colonias que reconstituyeron el factor GAL4, y contenían todos los genes nutricionales, sobrevivieron en los medios selectivos. Además evaluamos las colonias positivas por análisis visual del color de las colonias. El color azul es debido a la restitución del factor de transcripción del gen MEL1 que expresa la proteína α -galactosidasa, capaz de hidrolizar el sustrato X- α -gal y producir un precipitado de color azul intenso (Figura M1).

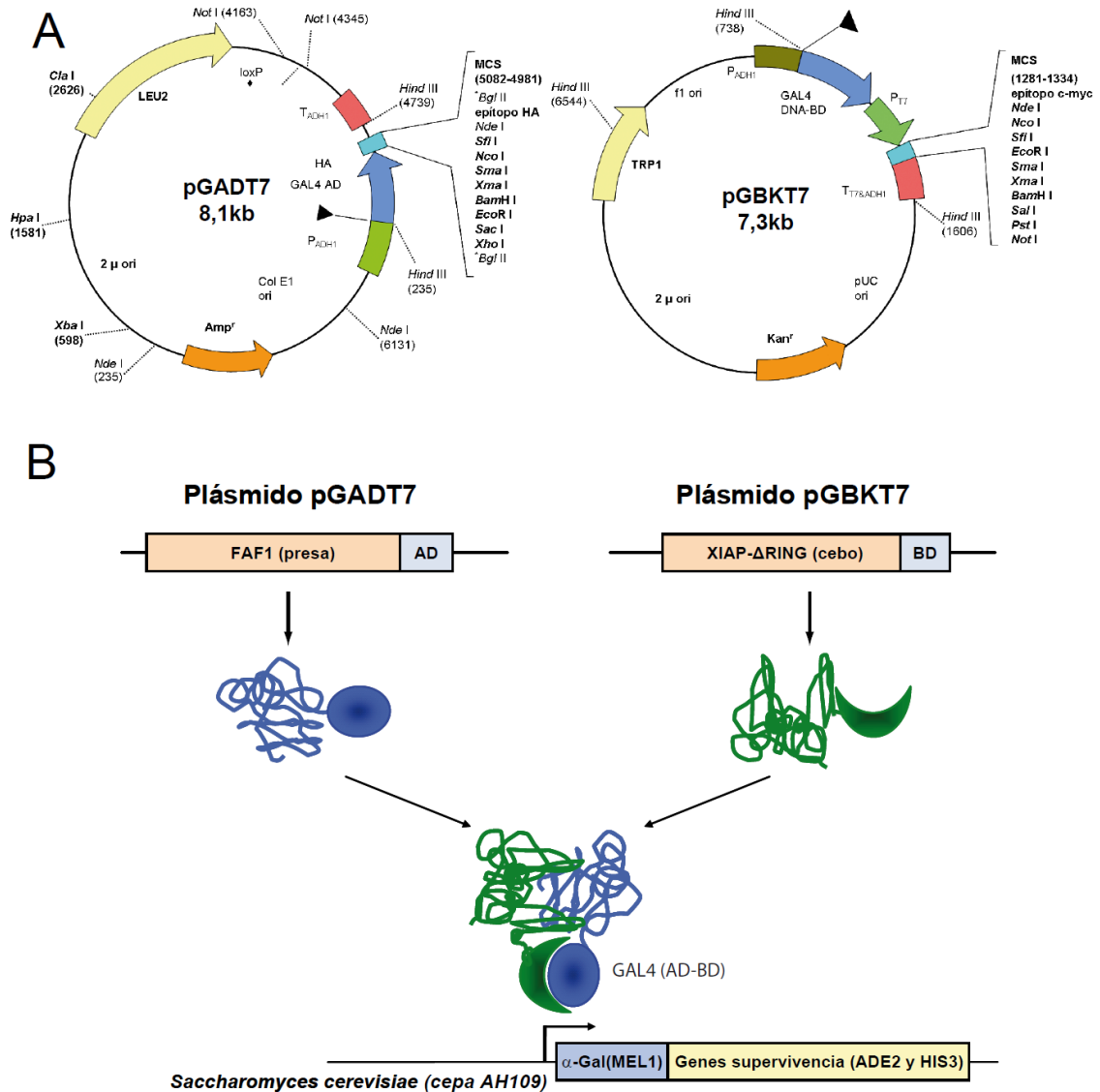


Figura M1. Esquema del ensayo de interacción XIAP-FAF1. A) Representación gráfica de los plásmidos pADT7 y pGBKT7 utilizados en la detección de la interacción entre las proteínas FAF1 y XIAP. **B)** Representación esquemática del ensayo interacción por actividad.

El ensayo β -galactosidasa que utilizamos para determinar la región mínima de interacción de XIAP para unirse a FAF1 esta basada en la misma técnica explicada en este apartado, pero utilizando una sola cepa de levaduras que se transforma con ambos plásmidos. Utilizamos las proteínas de fusión con los dominios de la proteína GAL4 de levaduras: BD-XIAP, BD-XIAP- Δ RING, BD-XIAP- Δ (BIR3-RING), BD-XIAP- Δ (BIR1-BIR2), en el vector de expresión en levaduras pGBKT7 y la proteína de fusión AD-FAF1 en el vector pGADT7, también de expresión en levaduras. Transformamos la cepa de levaduras Y187 con el plásmido pGADT7-AD-FAF1 y cada uno de los plásmidos que contenían las construcciones de XIAP nombrados anteriormente.

Cultivamos durante 24 horas a 30°C la levadura en medio YPD suplementado con ONPG (orto-nitrofenil-β-galactosido), que es un sustrato cromogénico de la enzima β-galactosidasa. Medimos la actividad β-galactosidasa de los cultivos, mediante un ensayo colorimétrico, midiendo absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro INFINITE 200Pro microplate-reader. Para representar en el gráfico, hayamos las Unidades de actividad β-galactosidasa (U_{gal}), donde 1 unidad esta definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de ONPG a O-nitrofenol y D-galactosa por minuto: $1000 \times DO_{420} / (t \times V \times DO_{600})$. Donde “t” es el tiempo de incubación en minutos, “V” es 0.1 ml multiplicado por el factor de concentración y DO_{600} es la Absorbancia a 600 nm de un 1 ml de cultivo.

5.5 Análisis de proteínas mediante *western-blot*

5.5.1 Medición de concentración de extractos celulares

Para mantener constante la cantidad de proteína que se emplea en el ensayo, medimos la concentración de proteína de los distintos extractos celulares, y se igualó su concentración. Medimos la concentración de proteína utilizando el método Bradford mediante el kit comercial Quick Start Bradford Protein Assay Kit (5000203; Bio-Rad, CA, EEUU), en placas de 96 pocillos de fondo plano. Para realizar la recta patrón utilizamos Albúmina de suero bovino incluido en el kit de medición. Medimos la absorbancia a 595 nm utilizando el espectrofotómetro INFINITE 200Pro microplate-reader (TECAN, Suiza).

5.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Realizamos la electroforesis de proteínas en condiciones reductoras en presencia de SDS y siguiendo el modelo de Laemmli . Las muestras se diluyeron en tampón de carga reductor (Tris-HCl pH6.8 0.2M, SDS 8%, Glicerol 27%, β-mercaptoetanol 20% y 0.04% azul de bromofenol), salvo en los experimentos de ubiquitinación que se utilizó un tampón de carga con el agente reductor DTT 0.4M en vez de β-mercaptoetanol 20%. Utilizamos geles con una fase concentradora al 5% de acrilamida (Acrilamida/bis-acrilamida 5%, Tris-HCl pH 6.8 0.125M, SDS 0.1%, Persulfato amónico 0.1%,

TEMED 0.1%) y una fase separadora a diferentes porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida (6, 8, 10 ó 12%) según el peso molecular de las proteínas estudiadas (Acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl pH 8.8 0.375M, SDS 0.1%, Persulfato amónico 0.1%, TEMED 0.4%). Hervimos las muestras durante 5 minutos (Thermomixer comfort, Eppendorf, Alemania). Como patrón de peso molecular utilizamos PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, MA, EEUU). Llevamos a cabo la electroforesis en tampón de electroforesis Tris/Glycine/SDS buffer (Bio-Rad, CA, EEUU) y un potencial de 90V durante 1-3 horas.

5.5.3 Inmunomarcaje de proteínas (western-blot)

Desarrollamos la detección de proteínas basándonos en el método original de Harry Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979) . Transferimos las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida-SDS a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μm de poro (GE Healthcare, WI, EEUU) o de polifluoruro de vinileno (PVDF) de 0,45 μm de poro (Millipore, MA, EEUU) activadas con Metanol durante 2 minutos en agitación. El tipo de membrana a utilizar se decidió según las especificaciones del anticuerpo a utilizar. Realizamos la electrotransferencia húmeda con el tampón de transferencia Tris-Glicina (25mM Trizma base, 190mM glicina, 0,1% SDS) con 20% Metanol durante 1 hora 45 minutos a un voltaje de 60V, ó semi-seca durante 45 minutos utilizando un voltaje de 20V. Utilizamos un método u otro dependiendo del tamaño de las proteínas a detectar. Utilizamos tampón de transferencia sin metanol para proteínas de más de 100 KDa. Posteriormente bloqueamos la unión inespecífica a la membrana incubando con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (5% de leche (Central Lechera Asturiana SA, España) ó 5% de Albumina de suero bovino (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) disuelta en TBS-Tween 0.05% (Tampón TBS: Tris base 20mM, NaCl 150mM, KCl 3mM, HCl hasta pH 7.6)). Realizamos la incubación con el anticuerpo primario en 5% leche o 5% albúmina acorde con lo utilizado en el proceso de bloqueo y lo incubamos a 4°C toda la noche o 2 horas a temperatura ambiente a una dilución de 1:1000. Realizamos 3 lavados en 30 ml de TBS-Tween 0.05% durante 15 minutos e incubamos las membranas en 5% leche con TBS-Tween 0.05% y los anticuerpos secundarios de cabra frente a conejo o ratón, según el anticuerpo primario utilizado, y acoplados a la peroxidasa de rábano, HRP (ThermoFisher Scientific, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:10000. El revelado de la señal

lo realizamos incubando la membrana con el sustrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific, MA, EEUU). La luminiscencia se hizo visible mediante exposición en oscuridad de las membranas a películas fotográficas para detección de la emisión de luz. Amersham Hyperfilm (GE Healthcare, WI, EEUU) y revelándose con el equipo Kodak X-omat 1000 (Kodak, NY, EEUU).

5.5.4 Ensayo de procesamiento de caspasas

Para la detección de las caspasas utilizamos el protocolo general descrito para el análisis de proteínas, realizando algunos cambios en los tiempos de electrotransferencia del método de *western-blot*, debido a la dificultad para su detección. Transfectamos cultivos de células HeLa durante 36 horas con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP, pcDNA3.1-HA-FAF1 y pcDNA3.1, manteniendo constante la cantidad de DNA utilizado en cada caso. Tratamos las células con anti-CD95/Fas (100 ng/ml) (Roche, Suiza) y Ciclohexamida (2.5 μ M) (Sigma, MO, EEUU) durante 16 horas y obtuvimos los extractos celulares con el tampón de lisis de caspasas. Detectamos las proteínas se mediante SDS-PAGE y *western-blot* descritos anteriormente, realizando la electrotransferencia de las caspasas procesadas en transferencia semiseca con un voltaje de 15 V durante 1h15' y el resto de proteínas en electrotransferencia húmeda con un voltaje de 55V durante 2 horas, utilizando los anticuerpos primarios anti-caspasa 3, anti-caspasa 3 activa, anti-caspasa 7, anti-caspasa 8, anti-caspasa 9 y anti-PARP.

5.6 Ensayo GST Pull-down

Transfectamos cultivos de células HeLa con el vector pEGFP-C1-FAF1 las 48 horas, obtuvimos el extracto celular mediante el protocolo general de lisis. Transformamos la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) con los plásmidos pGEX3T4 (vacío) o pGEX3T4-XIAP que expresan GST o la proteína de fusión GST-XIAP. Crecimos el cultivo durante 24 horas en medio selectivo con ampicilina para evitar el crecimiento de bacterias que no contengan la resistencia proporcionada por los plásmidos y lisamos las células para obtener las proteínas GST y GST-XIAP. Purificamos la proteína GST y la proteína de fusión XIAP-GST incubando los extractos con glutatión sefarosa (glutathione-Sepharose 4B beads; GE Healthcare, WI, EEUU)

quedando unidas a estas y finalmente lavamos las bolas de sefarosa varias veces con tampón de lisis general para desechar las proteínas no deseadas. Para nuestros ensayos, empleamos 100 µg de extracto celular e incubamos con 1 µg de GST o GST-XIAP inmovilizados con glutatión-sefarosa durante 4 horas a 4°C en tampón de lisis general. Lavamos las muestras 4 veces con tampón de lisis general, y resolvimos mediante electroforesis SDS-PAGE, electro transferencia húmeda y detectamos los complejos mediante inmunoblot con anticuerpos anti GFP.

5.7 Inmunoprecipitación

Obtuvimos extractos celulares de los cultivos empleados y utilizamos una décima parte como control de cantidad total de proteína que detectamos posteriormente mediante *western-blot* y el resto del extracto se empleó para la inmunoprecipitación. Para evitar uniones inespecíficas con la sefarosa y/o la proteína A/G realizamos una preincubación de los extractos celulares con 10 µl de sefarosa que tenía acoplada la proteína recombinante A/G, (A/G protein Plus-sepharose; Novagen, Alemania) durante 45 minutos en agitación a 4°C y centrifugamos las muestras a 150g. Incubamos 30 µl de proteína A/G -sefarosa con anticuerpos específicos, anti-c-myc, anti-HA, o anti-XIAP (BD Bioscience, NJ, EEUU) a una concentración de 0,5 µg/ml durante 30 minutos a 4°C y añadimos el sobrenadante obtenido anteriormente tras la preincubación. Incubamos a 4°C durante toda la noche con agitación y lavamos las muestras 3 veces durante 30 minutos a 4°C con agitación con el tampón de lisis general. Resolvimos los inmunocomplejos por geles SDS-PAGE, posterior electrotransferencia, y detección de proteínas mediante inmunomarcado específico y revelado (*western-blot*).

5.8 Ensayo de ubiquitinación

Para detectar proteínas con cadenas de ubiquitina, utilizamos plásmidos con la proteína ubiquitina unida al marcador molecular His, para su posterior detección. Cotransfectamos cultivos de células HEK 293T en placas de 60mm durante 36 horas utilizando liposomas con los plásmidos pMT107-Ubiquitina-His y pcDNA3.1-FAF1-GFP ó pcDNA3.1-FAF1-HA, junto con una de las siguientes construcciones:

pcDNA3.1-XIAP, pcDNA3.1-XIAP- Δ RING ó pcDNA3.1, manteniendo constante la cantidad total de ADN transfectado. Tratamos los cultivos celulares con 40 μ M del inhibidor de proteosoma Z-Leu-Leu-Leu-al (C2211, Sigma, MO, EEUU) durante 4 horas para evitar la degradación de las proteínas marcadas con ubiquitina. Lavamos las células con PBS y recogimos las células de la placa de cultivo incubando 5 minutos con Tripsina-EDTA, centrifugamos 3 minutos a 1000 rpm y resuspendimos las células en 200 μ l de tampón de lisis de ubiquitinación. Purificamos los compuestos asociados a Histidina mediante el kit His-Spin Protein Miniprep (ZYMO research, CA, EEUU). La muestra atravesó una columna de resina de unión al marcador molecular His. Lavamos la resina y mediante un tampón específico del fabricante y eluimos los complejos que contenían el marcador molecular His. Realizamos la detección de los complejos proteicos mediante la técnica de *western-blot*, utilizando los anticuerpos primarios anti-GFP o anti-HA para detectar las proteínas de fusión FAF1-GFP ó FAF1-HA.

5.9 Ensayos de actividad del Factor Nuclear κ B

Para detectar la actividad del factor de transcripción NF- κ B utilizamos construcciones plasmídicas con secuencias de unión a NF- κ B unidas a proteínas bioluminiscentes. Cultivamos las células en placas de 96 pocillos opacas, de fondo plano. Transfectamos cultivos de células HEK 293T utilizando liposomas durante 36 horas con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP, pcDNA3.1-HA-FAF1, pcDNA3.1-c-myc- Δ RING, y/o pcDNA3.1-HA-FAF1- Δ CtDEDID junto con pcDNA3.1-promotor de NF- κ B-*luc* (gen reportero de la actividad κ B) y pcDNA3.1-*renilla-luc* (gen control de la bioluminiscencia de luciferasa). Mantuvimos constante la concentración total de ADN transfectado ajustando con el ADN del vector vacío pcDNA3.1. Tratamos las células estimuladas con TNF α (Peprotech[®], NJ, EEUU) 20 ng/ml durante 6 horas. Utilizamos el kit comercial Dual-Glo Luciferase kit (Promega, WI, EEUU) para medir la actividad NF- κ B. Cambiamos el medio de cultivo a las células y añadimos 100 μ l de un primer tampón, provocando la ruptura de las membranas celulares y proporcionando el sustrato para la enzima luciferasa. Incubamos en oscuridad durante 28 minutos, momento en el que la señal tiene valores altos y estables y medimos la luminiscencia en el espectrofotómetro INFINITE 200Pro microplate-reader. Añadimos 100 μ l del segundo tampón que bloquea la actividad de luciferina y aporta el sustrato a la

luciferasa de *Renilla*. Incubamos 28 minutos y volvemos a medir la luminiscencia de los pocillos, obteniendo un valor de normalización de los plásmidos de luciferasa transfectados.

5.10 Ensayos de actividad bioquímica de caspasas

Llevamos a cabo la medida de la actividad de las caspasas 3/7 y de la caspasa 8 en células HeLa cultivadas en placas de 96 pocillos opacas de fondo plano, que transfectamos utilizando liposomas durante 36 horas con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP y/o pcDNA3.1-HA-FAF1. Tratamos las células con anti-CD95/Fas (100 ng/ml) y Ciclohexamida (2,5 μ M) (Sigma, MO, EEUU) durante 24 horas. Detectamos la actividad de las caspasas 3/7 mediante el kit comercial Caspase-Glo 3/7 Assay y Caspase-Glo 8 Assay (Promega, WI, EEUU). Añadimos 100 μ l de tampón de lisis Caspase-Glo proporcionado en el kit, que lisa las células directamente sobre la superficie de cultivo, proporcionando además un sustrato de caspasa 3/7 o caspasa 8, que al ser cortado genera luminiscencia. Incubamos 30 minutos para alcanzar un máximo de luminiscencia estable y medimos la luminiscencia en el espectrofotómetro INFINITE 200Pro microplate-reader.

5.11 Ensayo de Inmunocitoquímica

Para los estudios con proteína sobreexpresada, cultivamos las células HeLa en sistemas de cámara de cultivo sobre portaobjetos, especialmente preparados para inmunocitoquímica, divididos en 8 pocillos (Lab-Tek[®] Nunc, IL, EEUU). Transfectamos las células con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP y/o pcDNA3.1-HA-FAF1, utilizando un total de 1 μ g de ADN por pocillo. Lavamos las células con PBS (*Phosphate Buffer Saline*) y las fijamos con paraformaldehído 4% (Sigma, MO, EEUU) disuelto en tampón PBS durante 20 minutos. Lavamos las células 3 veces durante 5 minutos con PBS, bloqueamos los cultivos y los permeabilizamos con una solución de PBS-BSA (*Bovin Serum Albumin*) 1% + Digitonina 100 μ M durante 10 minutos. Posteriormente incubamos con el anticuerpo primario (en PBS-BSA 0,1% + Digitonina 100 μ M) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios

que utilizamos fueron anti-HA conejo y anti-c-myc ratón a una concentración 1:1000 diluidos en la solución de bloqueo. Efectuamos 3 lavados de 10 minutos en agitación e incubamos con los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos Alexa 594 anti-conejo y Alexa 488 anti-ratón (Molecular Probes. Invitrogen, CA, EEUU) a una concentración de 1:1000 en PBS-BSA 0,1%, durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Al terminar, realizamos 3 lavados de 10 minutos en PBS. Después, incubamos las células con 5µg/ml el marcador nuclear DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; D9542; Sigma, MO, EEUU) en PBS durante 10 minutos. Montamos las muestras con medio de montaje DAKO, (Barcelona, ESPAÑA). Finalmente examinamos las células por microscopía confocal de escaneo rápido (escáner resonante) (TCS SP5 Leica Microsystem, Alemania) utilizando el software proporcionado por el mismo fabricante LAS AF. De cada célula se tomo un total de 9 secciones focales de 0,63 micras de altura, con lente de inmersión 63X, separadas en 1 micrómetro. Posteriormente seleccionamos el plano con mayor cantidad de citoplasma para ser analizado.

Para los ensayos de localización de las proteínas endógenas realizamos el protocolo de inmunocitoquímica, con algunas modificaciones: Cultivamos células HeLa sobre cubreobjetos de vidrio (CB00120RA1, ThermoFisher, MA, EEUU) tratado con poli-L-Lisina (P6282, Sigma, MO, EEUU) y colocados en placas de cultivos de 24 pocillos. La incubación de las células con el tampón de permeabilización y bloqueo la realizamos toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios que utilizamos fueron: anti-FAF1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-XIAP (Abnova, Taipei, Taiwán) y anti-CD95/Fas a una concentración de 1:200. La incubación con los anticuerpos primario y secundario la realizamos por tensión superficial, colocando 30 µl de anticuerpo sobre una superficie plástica y depositando el cubreobjetos sobre ella. Finalmente, utilizamos el medio de montaje para preparar los cubreobjetos con las células sobre cristales portaobjetos (10143352, Superfrost™PLUS, ThermoFisher, MA, EEUU).

Para los gráficos de intensidad de señal en un corte axial. Dibujamos una línea que atravesase gran parte de núcleo y citoplasma en su trayectoria, y que fuera lo mas representativo posible del total de células capturado. Mediante el software Imagen (NIH, EEUU), obtuvimos el valor de los píxeles de cada canal situado en la trayectoria de la línea y los representamos en el eje Y, enfrentados a la distancia en micrometros al inicio de la línea.

Para los estudios de colocalización cuantitativa, analizamos las imágenes obtenidas mediante el software Image J. Transformamos las imágenes a escala de grises y 8-bits y substrajimos el fondo de cada imagen mediante el cálculo de 3 veces la desviación media mas la media de una región del fondo. Realizamos los análisis de colocalización con el plugIn de Imagen, JACOP obteniendo distintos coeficientes que proporcionan una medida de la paridad de las intensidades de fluorescencia procedentes de cada una de las proteínas estudiadas. Los índices calculados, son el Coeficiente de correlación de Pearson (PR), que puede tomar valores entre -1 y 1. Siendo -1 total deslocalización, 0 colocalización al azar y 1 máxima colocalización y el Coeficiente de solapamiento (R), que puede tomar valores desde 0 (baja colocalización) hasta 1 (alta colocalización). Ambos coeficientes indican una proporcionalidad general de píxeles colocalizados. De igual modo, utilizamos otros coeficientes que ofrecen un valor de colocalización para cada señal de inmunomarcaje: Coeficientes de colocalización M1/M2 y coeficientes de solapamiento k_1/k_2 . Los coeficientes M1/M2, representan una proporción de píxeles de una señal de inmunomarcaje (Alexa 594) que colocaliza con la otra señal de inmunomarcaje (Alexa 488) sin tener en cuenta la intensidad de los píxeles colocalizados, por lo que se establece un umbral a partir del cual la intensidad de un píxel es suficiente para interpretar que colocaliza con la intensidad procedente del otro canal. Pueden tomar valores entre 0 (no colocalización) y 1 (máxima colocalización) Los coeficientes k_1/k_2 proporcionan una información similar a los coeficientes M1/M2 pero teniendo en cuenta además la intensidad de los píxeles que colocalizan. El valor 1 indicaría la máxima colocalización y pueden tomar valores por encima y por debajo de 1 dependiendo de la diferencia de intensidad que aporte cada canal a la colocalización. Las fórmulas matemáticas de los índices utilizados se resumen en la siguiente tabla:

Coefficientes de correlación de Pearson, R_p .	$R_p = \frac{\sum (R_i - \bar{R}) \times (V_i - \bar{V})}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R})^2 \times \sum (V_i - \bar{V})^2}}$
Coefficientes de solapamiento, R.	$R = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sqrt{\sum (R_i)^2 \times \sum (V_i)^2}}$
Coefficientes de colocalización M_1 y M_2 .	$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i} \quad M_2 = \frac{\sum V_{i,coloc}}{\sum V_i}$
Coefficientes de solapamiento k_1 y k_2 .	$k_1 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{(R_i)^2} \quad k_2 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{(V_i)^2}$

Tabla M3. Coeficientes de solapamiento de señal inmunofluorescencia utilizados en los estudios de colocalización cuantitativa. La tabla muestra el nombre, abreviatura si procede, y las fórmulas matemáticas para su cálculo. Las letras R y V son los valores de intensidad de fluorescencia de los píxeles de los canales 1(rojo) y 2(verde) respectivamente.

Para cada par de imágenes se obtuvo también la significancia del valor del índice de Pearson, mediante los test de colocalización: Randomización de Costes y Función de correlación cruzada de Van Steensel. La randomización de Costes, obtiene 50 imágenes modificadas de la original de uno de los canales, mediante la reordenación aleatoria de cuadrados de la imagen original de 5 píxeles cuadrados. Después compara los valores de Pearson de las imágenes aleatorias con el valor de Pearson de las imágenes originales, obteniendo un valor de probabilidad. Esto indica si el coeficiente de Pearson hallado originalmente es consecuencia del solapamiento de la intensidad de las proteínas o a la señal aleatoria proveniente de cada canal. La función de correlación cruzada de Van Steensel, desplaza la imagen de uno de los canales de 1 a 20 píxeles a la izquierda y a la derecha de la imagen original y halla el valor de Pearson con cada una de esas imágenes desplazadas. Los valores de Pearson deben tener un máximo en las imágenes originales e ir disminuyendo al desplazarse la imagen hacia los lados, obteniéndose en el caso de una colocalización no debida al azar, unos valores que se ajustan a una curva normal o gaussiana).

5.12 Ensayo de viabilidad por morfología celular

Cultivamos células HeLa en placas de 96 pocillos y transfectamos con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP y/o pcDNA3.1-HA-FAF1 durante 24 horas, utilizando el vector pcDNA3.1 vacío para mantener las cantidades de ADN transfectado

constantes. Tratamos los cultivos con anti-CD95/Fas 100 ng/ml durante 16 horas, fijando posteriormente las células con paraformaldehído 4% durante 20 minutos. Bloqueamos los cultivos y los permeabilizamos con una solución de PBS-BSA (*Bovin Serum Albumin*) 1% + Digitonina 100 μ M durante 10 minutos. Incubamos las preparaciones con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, MO, EEUU) disuelto 1:10000 en PBS durante 10 minutos. Seleccionamos visualmente las células que sobreexpresaban las proteínas XIAP y FAF1 y valoramos la apoptosis celular mediante microscopio epifluorescente por su morfología nuclear utilizando la fluorescencia del marcador nuclear DAPI. Finalmente analizamos las imágenes con el programa de análisis de imagen ImageJ.

5.13 Estudio de viabilidad y análisis morfológico automatizado

Utilizamos cultivos de células HeLa, que transfectamos con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP y pcDNA3.1-HA-FAF1 durante 24 horas. Posteriormente los incubamos durante 15 minutos con el colorante nuclear Hoechst-33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, Sigma-Aldrich, MO, EEUU) a una concentración de 5 μ g/ml, que atraviesa la membrana de la célula viva y tiñe fluorescentemente el núcleo, y con el colorante vital Calceína-AM (Calceína acetoximetil ester, Sigma-Aldrich, MO, EEUU) a una concentración de 5 μ M que también atraviesa la membrana celular y se torna fluorescente al ser sustrato de esterasas citoplasmáticas, quedando además atrapado en la célula. Las células vivas se estudiaron directamente con el analizador celular robotizado de microscopía epifluorescente (GE INCell 1000 Analyzer). Para el análisis de las poblaciones apoptóticas diseñamos una máscara con el programa informático de análisis InCell. La máscara estaba compuesta de varios filtros.

1. Filtro de supervivencia: En el que se medía la Intensidad de señal de la Calceína en la célula y según la misma se dividía a las células en 2 poblaciones (Calceína positivas y negativas).

2. Filtro de Morfología nuclear dividía las células en células con el núcleo condensado o no condensado según la Intensidad del Hoechst en el núcleo en la fórmula (covarianza de Intensidad_{núcleo} / Intensidad_{núcleo}).

3. Filtro de retracción, que calcula el Área de la célula/I núcleo, y nos da un valor de cómo la célula se acerca a una forma más redondeada.

4. Morfología celular, que marcaba a las células como vivas y muertas según la fórmula (Área celular / Factor de forma de la célula) El factor de forma es un valor que se aproxima a 1 cuando la célula es redonda y a 0 cuanto más se aleja de la circularidad.

5. El último filtro es un árbol de decisiones en los que utilizamos los filtros de supervivencia y de Morfología nuclear para dividir las células en 4 poblaciones: Sanas (calceína positivas, núcleo no condensado), Muertas (calceína negativas y núcleo condensado) y dos poblaciones intermedias (calceína positivas, núcleo condensado) y (calceína negativas, núcleo no condensado). Además de estos filtros tomamos, de cada célula, los siguientes datos: Área, área nuclear, Intensidad de fluorescencia del núcleo y Covarianza de la intensidad de fluorescencia del núcleo.

Realizamos un análisis de poblaciones mediante ACP (Análisis de Componentes Principales). Este análisis genera un conjunto de variables, los componentes o vectores propios, que son combinaciones lineales de las variables originales que cumplen dos requisitos: 1) cada componente absorbe el máximo de variabilidad remanente en los datos, de forma que la 1ª componente absorbe el máximo de variabilidad de los datos originales, la segunda absorbe el máximo restante y así sucesivamente; y 2) cada componente es ortogonal, es decir, independiente del resto de las componentes.

5.14 Citometría de flujo

Transfectamos cultivos de células HeLa con los vectores de expresión pcDNA3.1-c-myc-XIAP y pcDNA3.1-HA-FAF1 durante 36 horas. Incubamos los cultivos con o sin estaurosporina 12,5 nM durante 18 horas. Recogimos el medio de cultivo para no perder ninguna célula y recogimos las células adheridas incubando 5 minutos con tripsina-EDTA. Desactivamos la enzima tripsina añadiendo medio suplementado con suero y obtuvimos una solución de las células que añadimos al medio anterior. Centrifugamos 3 minutos a 1000g, lavamos con PBS a 4°C y procedimos a su permeabilización y fijación con una solución de etanol 70% a -20°C. Posteriormente procedimos a su tinción resuspendiendo en tampón DAPI-Nonidet P40 pH 7.4 (NaCl 146 mM, Tris base 10 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 22 mM, 0,05g BSA, Igepal CA-630 0,1%, DAPI 10 µl/ml y HCl para ajustar el pH). Incubamos las células 15 minutos a temperatura ambiente en

oscuridad y analizamos las suspensiones de células con el equipo de citometría de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, NJ, EEUU). Utilizamos gráficos de ancho de pulso frente al área para descartar los agregados de las células individuales. Recogimos un total de 30000 eventos individuales mediante el software FACS Diva 6.1. Posteriormente, analizamos las poblaciones de células con el software FlowJo (Tree Star, OR, EEUU) obteniendo el estado del ciclo celular y tomando como población apoptótica las células en estado sub G0/G1.

5.15 Análisis estadísticos

El análisis de los efectos de los tratamientos (transfecciones, estimulación, ...) se realizaron mediante análisis de t de Student de 1 ó 2 colas o mediante el análisis ANOVA de 1 vía para tratamientos con más de dos posibles estados (vg. comparación del efecto de la transfección con diferentes mutantes) y las posteriores comparaciones “*posthoc*” entre tratamientos empleando el método de Bonferroni implementado en el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EEUU). El análisis de componentes principales (ACP), así como los ANOVAs de 2 y 3 vías (y modelos mixtos) se realizaron mediante el lenguaje de análisis estadístico R (R Core Team (2014). <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria), empleando la función PCA de la librería Hmisc para realizar los ACP. Para los ANOVAs de 2 o 3 vías se empleó la función `anova` sobre el modelo lineal ajustado con la función `lme` de la librería nlme y posteriormente se analizaron los términos de interacción mediante el comando `testInteractions` de la librería Phia. En todos los análisis consideramos el efecto del tratamiento significativo si $p < 0,05$. Los niveles de significación menores de 0,001 se codificaron con 3 estrellas (***), los menores de 0,01 con 2 estrellas (**) y los menores de 0,05 con una estrella (*).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 VERIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE XIAP y FAF1

En la búsqueda de nuevas proteínas que interaccionen con la proteína inhibidora de apoptosis XIAP, se realizó un estudio de cribado mediante el ensayo de dos híbridos en levadura, utilizando el mutante truncado de XIAP, XIAP- Δ RING, como cebo (*bait*) y una librería de ADNc de cerebro humano de neonato como presa (*prey*). De este análisis, se obtuvieron 55 clones positivos de un total de ~108 clones cribados. Dos de los clones positivos contenían la secuencia completa de FAF1 humano (número de referencia en NCBI: NM_007051.2).

Para verificar la interacción entre FAF1 y XIAP observada en el cribado de dos híbridos realizamos un ensayo con cultivos de la cepa de levadura AH-109, transformada con los plásmidos de expresión mostrados en la tabla R1. Solo cuando se cotransforman los plásmidos que expresan las proteínas de fusión XIAP-BD y FAF1-AD, se induce la expresión de los genes para crecer en los medios de selección y la expresión de la enzima α -galactosidasa, que produce el color azul de las colonias. Evaluamos el color y supervivencia en medios nutricionales restrictivos de las colonias mediante observación directa. El control positivo pCL-1 que contiene la proteína íntegra GAL4 y las colonias transformadas con los plásmidos XIAP-BD y FAF1-AD, indujeron la expresión de los genes para crecer en el medio de selección en ausencia de His y Ade y además presentaron color azul, lo que indica la actividad de la proteína GAL4. Los demás cultivos no reconstituyeron la proteína GAL4, por lo que no crecieron debido a la falta de genes nutricionales (Tabla R1).

CEBO	PRESA	SD-L	SD-W	SD-L-W	SD-L-W-H-A+3AT	Color
	pCL-1	+	—	—	—	Azul
XIAP-BD	AD-vector	+	+	+	—	Blanco
BD-vector	FAF1-AD	+	+	+	—	Blanco
Lam-BD	FAF1-AD	+	+	+	—	Blanco
XIAP-BD	FAF1-AD	+	+	+	+	Azul

Tabla R1. Ensayo de interacción de FAF1 y XIAP en levadura. Los plásmidos de expresión en levadura empleados en cada experimento se muestran en la parte izquierda. En la parte superior se indica las condiciones de restricción nutricional de cada medio de cultivo, a los que se le eliminaron aminoácidos esenciales según el caso (Leucina(L), triptófano(W), histidina(H) y adenina(A)) y añadimos el compuesto 3AT que hace a las levaduras dependientes de la histidina exógena. La tabla muestra si las levaduras crecieron en dichos medios (+) o si su crecimiento se vio impedido (-). El control positivo es el plásmido pCL-1 que contiene el gen completo GAL4 y Lam-BD es un control de interacción inespecífico. El color azul de las colonias indica la hidrólisis del sustrato X- α -Gal. El crecimiento y color azul de las colonias que presentan los plásmidos que contienen XIAP-BD y FAF1-AD indican una interacción específica entre las proteínas XIAP y FAF1.

Para confirmar la interacción entre XIAP y FAF1 observada en levadura, realizamos un ensayo *in vitro* de precipitación con glutatión (GST *pull-down*). Purificamos e inmovilizamos la proteína de fusión GST-XIAP, expresada en bacteria (*Escherichia coli*), en columnas cargadas con glutatión-sefarosa. Al mismo tiempo, obtuvimos extractos celulares de cultivos de la línea celular humana HeLa que sobreexpresaban las proteínas EGFP y EGFP-FAF1. Estos extractos fueron incubados en columnas de glutatión-sefarosa que mantenían adheridas las proteínas de fusión XIAP-GST o GST como control. Analizamos los eluidos mediante *western-blot* con el anticuerpo específico contra la proteína EGFP. La figura R1 (paneles de la izquierda) muestra los extractos de las células que sobreexpresaron las proteínas de fusión EGFP (28 KDa) y EGFP-FAF1 (95 KDa). Mostramos los eluidos de estos extractos al pasarse a través de las columnas de GST o XIAP-GST en los paneles centrales (eluido de FAF1-EGFP) y de la derecha (eluido de EGFP). El anticuerpo específico frente a EGFP solo detectó señal en los eluidos procedentes de los extractos celulares con FAF1-EGFP al atravesar la columna con XIAP-GST y no se observa ninguna señal en el resto de casos (FAF1-EGFP + sefarosa-GST, EGFP + sefarosa-XIAP-GST y EGFP + sefarosa GST) demostrando la especificidad de la interacción XIAP-FAF1.

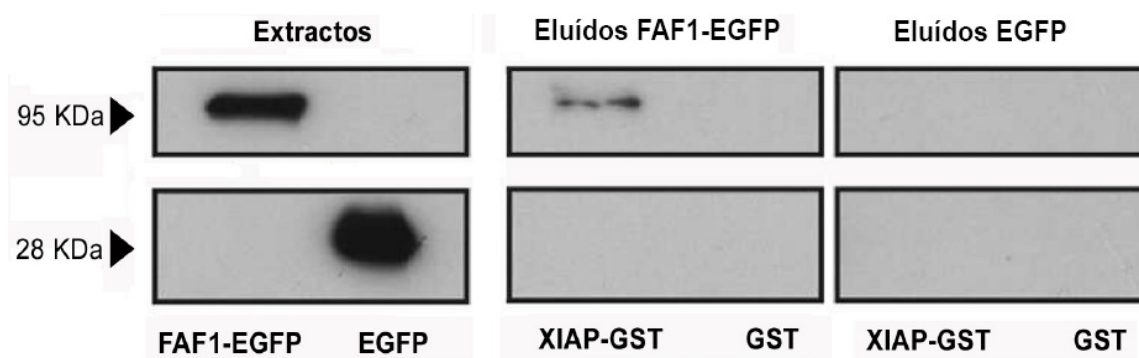


Figura R1: Interacción FAF1-XIAP *in vitro* mediante ensayo GST “pull-down”. Transfectamos cultivos celulares de la línea cancerígena humana HeLa con el plásmido que expresa la proteína de fusión EGFP-FAF1 o EGFP como control. Los extractos celulares se incubaron con XIAP-GST o GST como control. Resolvimos los eluidos mediante *western-blot* e inmunomarcaje con el anticuerpo específico frente a EGFP. En los paneles izquierdos mostramos los extractos celulares de los cultivos que expresaban las proteínas de fusión FAF1-EGFP (95 KDa) y EGFP (28 KDa). En los paneles centrales y derechos, mostramos los eluidos que incubamos con las proteínas recombinantes XIAP-GST y GST. La precipitación de FAF1-EGFP en presencia de XIAP-GST indica una interacción específica entre XIAP y FAF1.

Si bien la levadura es una célula eucariota, el plegamiento de las proteínas en los organismos eucariota como levadura y mamífero tienen diferencias en la complejidad y en las moléculas responsables de este proceso (Young, Agashe et al. 2004), así como en las modificaciones post-transcripcionales como la acetilación y la glicosilación (Polevoda and Sherman 2003; Lehle, Strahl et al. 2006). Por ello procedimos a estudiar si esta interacción tiene lugar en células de mamífero.

Empleando la línea celular HeLa, transfectamos los plásmidos de expresión de la proteína de fusión EGFP-FAF1 (humana) y la proteína EGFP como control. Sometimos los extractos celulares a inmunoprecipitación con el anticuerpo contra la proteína de XIAP humana endógena y analizamos el eluido mediante *western-blot* con el anticuerpo específico contra la proteína EGFP.

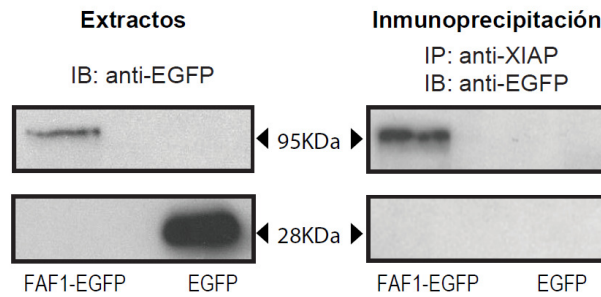


Figura R2. Interacción entre la proteína FAF1 y la proteína XIAP endógena. Transfectamos cultivos celulares HeLa con los plásmidos que expresan las proteínas de fusión EGFP-FAF1 o EGFP como control. Obtuvimos extractos celulares, que empleamos para una inmunoprecipitación, utilizando el anticuerpo específico contra la proteína XIAP endógena. Resolvimos los inmunocomplejos mediante inmuntaraje con el anticuerpo anti-EGFP (panel derecho). El panel izquierdo muestra el inmuntaraje de los extractos celulares con anticuerpo frente a EGFP. La inmunoprecipitación de HA-FAF1 en presencia de XIAP endógeno, indica una interacción específica XIAP-FAF1 en células eucariota.

Como mostramos en el panel derecho de la figura R2, se produjo el inmunoprecipitado de la proteína de fusión FAF1-EGFP a 95 KDa cuando se encontraba en presencia de la proteína XIAP inmovilizada. Los extractos que expresaban EGFP no precipitaron con inmunocomplejos de XIAP (panel derecho abajo). Estos resultados demuestran la interacción de FAF1 con XIAP endógeno en células humanas, en concordancia con los resultados ya obtenidos en los ensayos anteriores.

Por último, para verificar la interacción de ambas proteínas realizamos un ensayo de coinmunoprecipitación de las proteínas endógenas FAF1 y XIAP en células humanas. En primer lugar comprobamos mediante *western-blot* los niveles endógenos de expresión de ambas proteínas en varias líneas celulares, obteniendo buenos niveles en las 3 líneas estudiadas (Figura R3A). Seleccionamos la línea celular HeLa por tener buenos niveles de expresión de FAF1 y XIAP, así como haber sido utilizada previamente para los ensayos de inmunoprecipitación con XIAP endógeno. En la parte derecha de la figura R3B observamos la señal correspondiente a la inmunoprecipitación de la proteína FAF1 debida a la unión con XIAP endógena. En el carril central, se muestra el control de inmunoprecipitación que se realizó utilizando el anticuerpo isotipo IgG que no produce señal alguna.

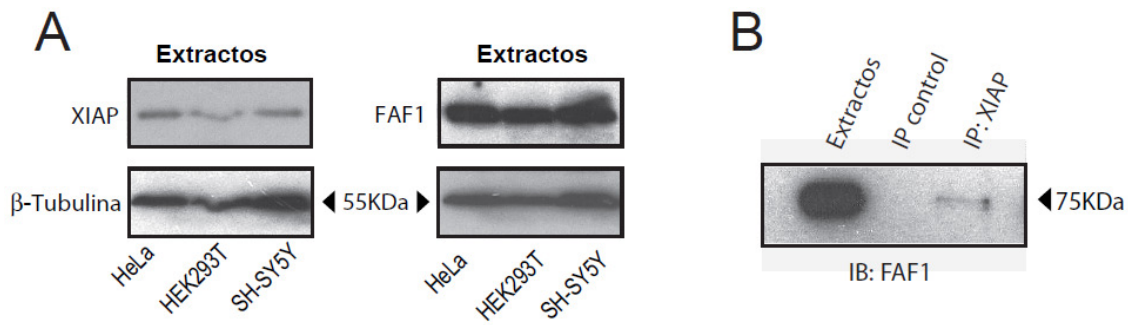


Figura R3. Interacción entre las proteínas FAF1 y XIAP endógenas. A. Niveles de expresión de las proteínas FAF1 y XIAP endógenas en las líneas celulares HeLa, HEK293T y SH-SY5Y. B. Immunoprecipitación de la interacción FAF1-XIAP. Realizamos un ensayo de inmunoprecipitación en extractos de cultivos celulares HeLa con un anticuerpo específico contra la proteína XIAP o con un anticuerpo isotipo IgG control. Resolvimos los inmunocomplejos mediante *western-blot* utilizando el anticuerpo frente a la proteína FAF1. Este ensayo verifica la interacción entre XIAP y FAF1 en células eucaritota.

6.2. Análisis de la región de interacción entre XIAP y FAF1

Una vez verificada la interacción entre las proteínas XIAP y FAF1, nuestro siguiente objetivo fue determinar las regiones de cada una de las proteínas implicadas en la interacción, que nos ayudará a determinar la actividad biológica resultante de la unión de estas proteínas (Introducción, apartado 3.4 y 3.5)

Primero empleamos un ensayo *in vitro* de actividad β -galactosidasa en levaduras de la cepa Y187. Transformamos los cultivos con los plásmidos que expresan la proteína XIAP-BD o sus mutantes truncados (figura R4A), también unidos al dominio BD, y con la proteína FAF1-AD como presa. La actividad β -galactosidasa derivada de la interacción entre las proteínas presa y cebo se mide por la degradación del sustrato ONPG, que cuantificamos midiendo la absorbancia a 420 nm en el tiempo (U_{gal} , ver materiales y métodos, apartado 5.4). La figura R4B muestra que la interacción entre FAF1 y la proteína XIAP nativa produjo una actividad β -galactosidasa de $1,46 U_{gal} \pm 0,11$ ($n=5$) significativamente mayor ($P<0,005$, $T_2=16$, $n=3$) que la producida por el vector vacío y FAF1 ($0,32 U_{gal} \pm 0,14$; $n=3$). Igualmente, la delección del dominio RING o los dominios BIR3 y RING producen una actividad β -galactosidasa significativamente mayor que el control ($0,97 U_{gal} \pm 0,07$, $T_3=3,62$; $P<0,05$; $n=3$) y ($1,21 U_{gal} \pm 0,02$; $T_4=3,94$; $P<0,01$; $n=4$) respectivamente. Sin embargo, la delección de los dominios BIR1 y BIR2 reduce la actividad β -galactosidasa a $0,35 U_{gal} \pm 0,05$, siendo significativamente diferente al valor alcanzado por la proteína nativa ($P<0,01$;

T₂=13,64; n=3). Estos resultados revelan por tanto, a los dominios BIR1-BIR2 de XIAP como los responsables de la interacción con FAF1.

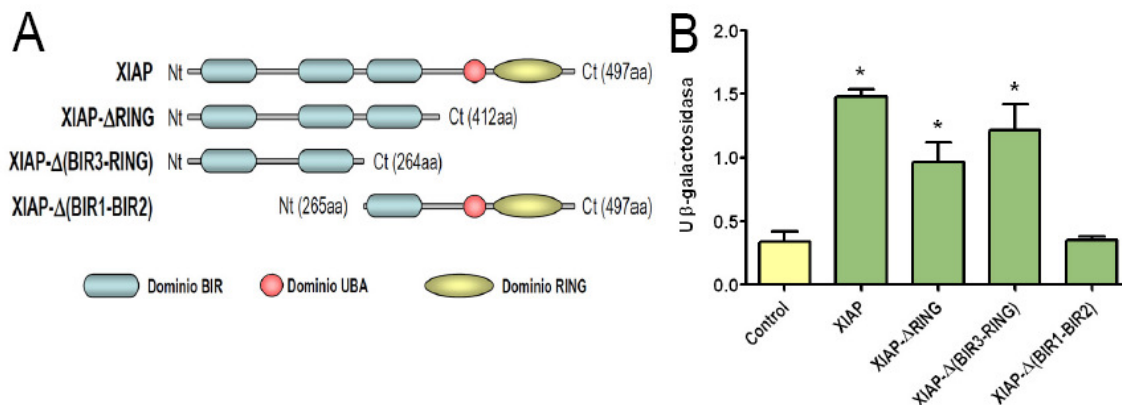


Figura R4. Identificación de la región de interacción de la proteína XIAP con la proteína FAF1 en levadura. **A.** Representación esquemática de la proteína XIAP y los mutantes utilizados en el ensayo. **B.** Unidades de actividad β-Galactosidasa (U_{gal}) de los diferentes cultivos de levadura que co-expresan XIAP o mutantes truncados (con el dominio BD de GAL4) con la proteína FAF1 (dominio AD de GAL4). Como control utilizamos el vector vacío pGBKT7 (P* < 0,01 frente a control). Cada valor es la media de 3 experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student de 1 cola. Este ensayo de β-galactosidasa muestra la interacción específica de la proteína FAF1 con XIAP y sus mutantes truncados XIAP-ΔRING y XIAP-Δ(BIR3-RING).

Para confirmar que la región que contiene a los dominios BIR de XIAP es la responsable de la interacción con FAF1, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de HA-FAF1 frente a XIAP y sus mutantes de delección (todos unidos al marcador molecular c-myc). Estas proteínas fueron sobreexpresadas en la línea celular humana HeLa y realizamos una inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-c-myc de los extractos celulares, los cuales resolvimos mediante *western-blot* con al anticuerpo anti-HA.

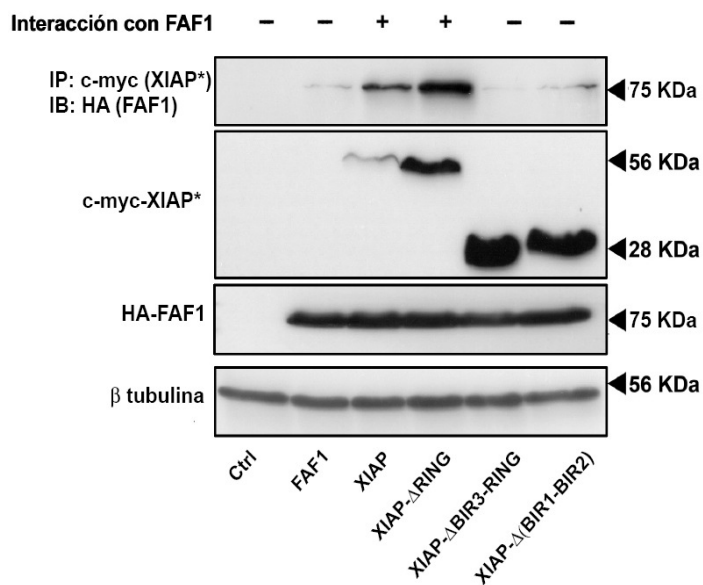


Figura R5. Identificación de la región de interacción de la proteína XIAP con la proteína FAF1 en células HeLa. Sobreexpresamos las proteínas de fusión HA-FAF1 y c-myc-XIAP o cada uno de sus mutantes de delección en la línea celular HeLa. Obtuvimos extractos celulares y los inmunoprecipitamos (IP) con el anticuerpo anti-c-myc. Resolvimos los inmunocomplejos mediante *western-blot* con el anticuerpo anti-HA. El panel superior muestra la inmunoprecipitación de la proteína FAF1 con la proteína nativa XIAP y el mutante XIAP-ΔRING. Los paneles inferiores muestran la expresión de las proteínas de estudio y los niveles de la proteína β-tubulina, como control de carga.

Como puede observarse en la figura R5B la proteína nativa XIAP, así como el mutante de delección XIAP-ΔRING, muestran una clara interacción con FAF1 (Figura R6, panel superior). Sin embargo, no se observa interacción apreciable entre FAF1 y los mutantes XIAP-Δ(BIR3-RING) y XIAP-Δ(BIR1-BIR2). Estos resultados muestran la importancia de la región que abarca los 3 dominios BIR en la interacción de XIAP con FAF1.

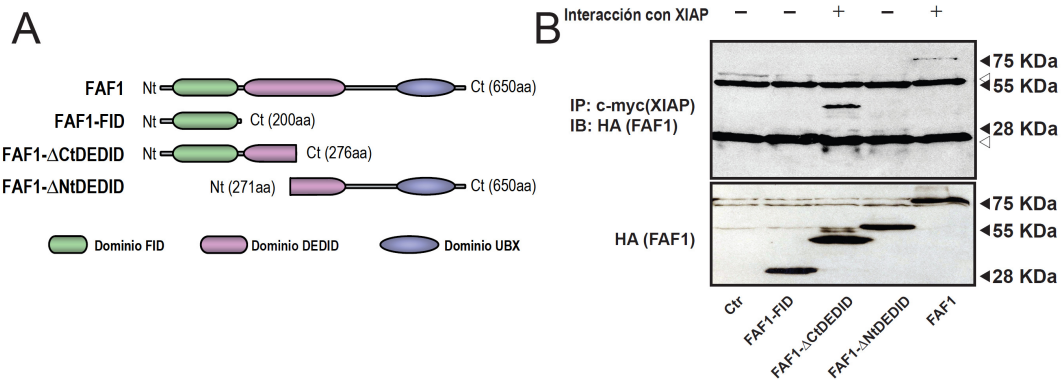


Figura R6. Identificación de la región de interacción de la proteína FAF1 con la proteína XIAP. A. Representación esquemática de los mutantes de delección de la proteína FAF1 utilizados en los ensayos. **B.** Sobreexpresamos las proteínas de fusión c-myc-XIAP y HA-FAF1 o cada uno de sus mutantes de delección en la línea celular Neuro-2a. Obtuvimos extractos celulares y los inmunoprecipitamos con el anticuerpo anti-c-myc. Resolvimos los inmunocomplejos mediante *western-blot* utilizando el anticuerpo anti-HA. El panel superior muestra la inmunoprecipitación de la proteína HA-FAF1 y el mutante FAF1-ΔCtDEDID con la proteína c-myc-XIAP. Los paneles inferiores muestran la expresión de las proteínas de estudio y los niveles de la proteína β-tubulina, como control de carga. El panel superior muestra la formación de inmunocomplejos de HA-FAF1 y c-myc-XIAP. Las flechas blancas indican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. Sobre el panel superior se indica los mutantes de la proteína FAF1 que resultaron tener interacción con la proteína XIAP. El panel inferior muestra las cantidades de la proteína de fusión HA-FAF1 y de sus mutantes presentes en los extractos.

Una vez establecida la región de interacción en XIAP, seguimos con el estudio de la región de interacción en la proteína FAF1. Sobreexpresamos la proteína c-myc-XIAP junto con la proteína HA-FAF1 o sus mutantes de delección (con el marcador molecular HA) en cultivos celulares del neuroblastoma murino Neuro-2A. Sometimos los extractos celulares a un ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo contra el marcador c-myc. Analizamos los eluidos mediante *western-blot* utilizando el anticuerpo contra el marcador HA para detectar específicamente la presencia de la proteína FAF1 o sus mutantes. Como muestra la figura R6B en el panel superior, la proteína FAF1 nativa y el mutante FAF1-ΔCtDEDID inmunoprecipitaron con c-myc-XIAP. El mutante FAF1-FID (1-200aa) y el mutante FAF1-ΔNtDEDID (271-650aa) no interaccionaron con XIAP. Por lo tanto, la interacción con XIAP depende de la región de FAF1 que comprende el extremo amino terminal del dominio DEDID, aunque no podemos desechar la necesidad de parte o el total del dominio FID.

En conjunto, estos resultados muestran que se produce la interacción específica de XIAP y FAF1 en células eucariota de distintas especies (ratón y humano) y que esta interacción tiene lugar entre la región que engloba los dominios BIR de XIAP y al menos la región N-terminal del dominio DEDID de FAF1.

6.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE XIAP Y FAF1

Si bien los resultados obtenidos mostraron la existencia de interacción entre estas dos proteínas, esto no implica una interacción *in vivo*, ya que las proteínas pueden hallarse en compartimentos celulares aislados y solo interaccionar tras el proceso de lisis celular sufrido durante los análisis efectuados. Trabajos anteriores muestran como algunas proteínas que interaccionan con XIAP se encuentran aisladas en compartimentos distintos: Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 en la mitocondria, XAF1 localizada en el núcleo, o GSPT1/eRF3 asociada al retículo endoplasmático (Introducción, apartado 3.4.1). Para conocer la distribución celular de las proteínas XIAP y FAF1 abordamos un estudio mediante microscopía confocal de fluorescencia y análisis de imagen.

En primer lugar, indujimos la sobreexpresión transitoria de la proteína de fusión c-myc-XIAP en células HeLa. Realizamos una inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-c-myc y analizamos las células mediante microscopía confocal. Según observamos en la figura R7, la proteína XIAP sobreexpresada esta presente en toda la región citoplasmática y en la región nuclear con menor intensidad. Para conocer si la distribución en el interior celular es homogénea realizamos un gráfico de intensidades a lo largo de una línea que atravesaba la célula.

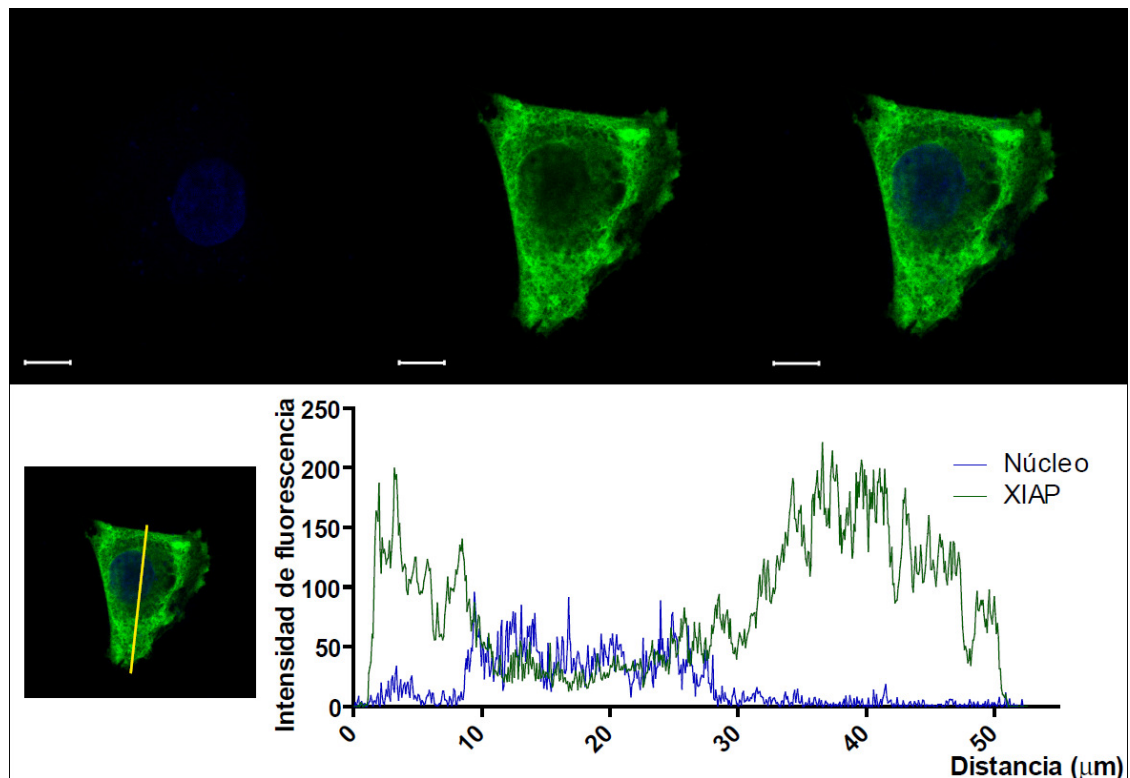


Figura R7: Localización celular de la proteína XIAP en células HeLa Panel superior, Ensayo de inmunocitoquímica en cultivos celulares HeLa que expresaron transitoriamente la proteína de fusión c-myc-XIAP, utilizando el anticuerpo anti-c-myc y el colorante fluorescente DAPI para la tinción del núcleo. La barra inferior indica la escala de 10 μm . El gráfico inferior es un gráfico de intensidades del corte axial de la célula (línea amarilla) en el que la línea azul indica el valor de intensidad de fluorescencia por píxel para el marcador nuclear DAPI y la línea verde indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína c-myc-XIAP.

De igual modo estudiamos la localización de FAF1, sobreexpresando en células HeLa la proteína de fusión FAF1-HA y realizando posteriormente una inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-HA. Como muestra la Figura R8, la proteína FAF1 sobreexpresada se encuentra situada principalmente en la región citoplasmática y muestra inmunomarcaje en el núcleo, de manera no homogénea, presentando zonas con menos señal que coinciden con estructuras nucleares teñidas con el marcaje nuclear DAPI.

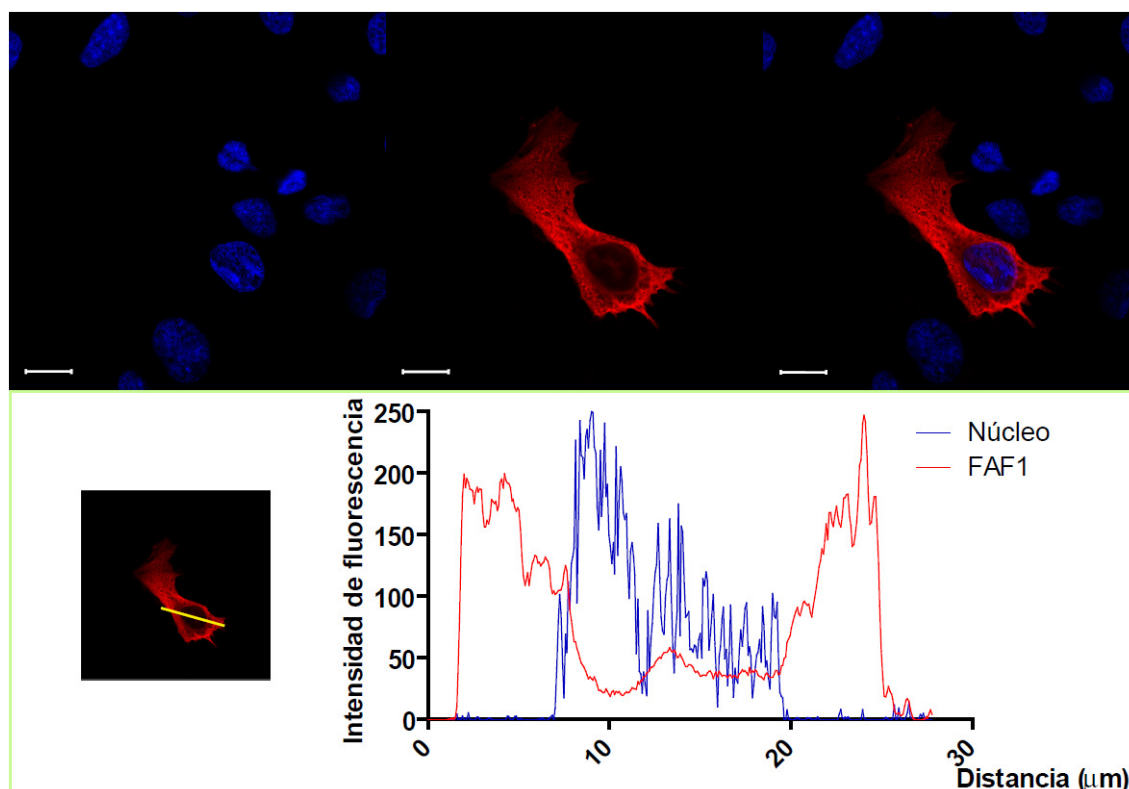


Figura R8: Localización celular de la proteína FAF1 en células HeLa. Panel superior, Ensayo de inmunocitoquímica en cultivos celulares HeLa que expresaron transitoriamente la proteína de fusión HA-FAF1, utilizando el anticuerpo anti-HA y el colorante fluorescente DAPI para la tinción del núcleo. La barra inferior indica la escala de 10 μm . El gráfico inferior es un gráfico de intensidades del corte axial de la célula (línea amarilla) en el que la línea azul indica el valor de intensidad de fluorescencia por píxel para el marcador nuclear DAPI y la línea verde indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína HA-FAF1.

Establecida la distribución celular de ambas proteínas, estudiamos la colocalización de las proteínas FAF1 y XIAP, para comprobar si la interacción se produce de forma homogénea o se produce específicamente en algunas regiones de la célula. Para conseguir este objetivo indujimos la sobreexpresión transitoria de las proteínas de fusión HA-FAF1 y c-myc-XIAP o GFP (control) en cultivos de células HeLa. Realizamos un ensayo de inmunocitoquímica y capturamos imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia. En las imágenes de la Figura R9 observamos que ambas proteínas se encuentran principalmente en el citoplasma, mostrando la proteína FAF1 una tendencia a situarse en la membrana plasmática. El gráfico de intensidades del corte axial de una célula representativa muestra una diferente aportación de ambos marcajes a lo largo de una línea que atraviesa la célula. Siendo la

contribución de FAF1 mayor en las proximidades de la membrana celular y la señal proveniente de la proteína XIAP mas homogénea en toda la célula.

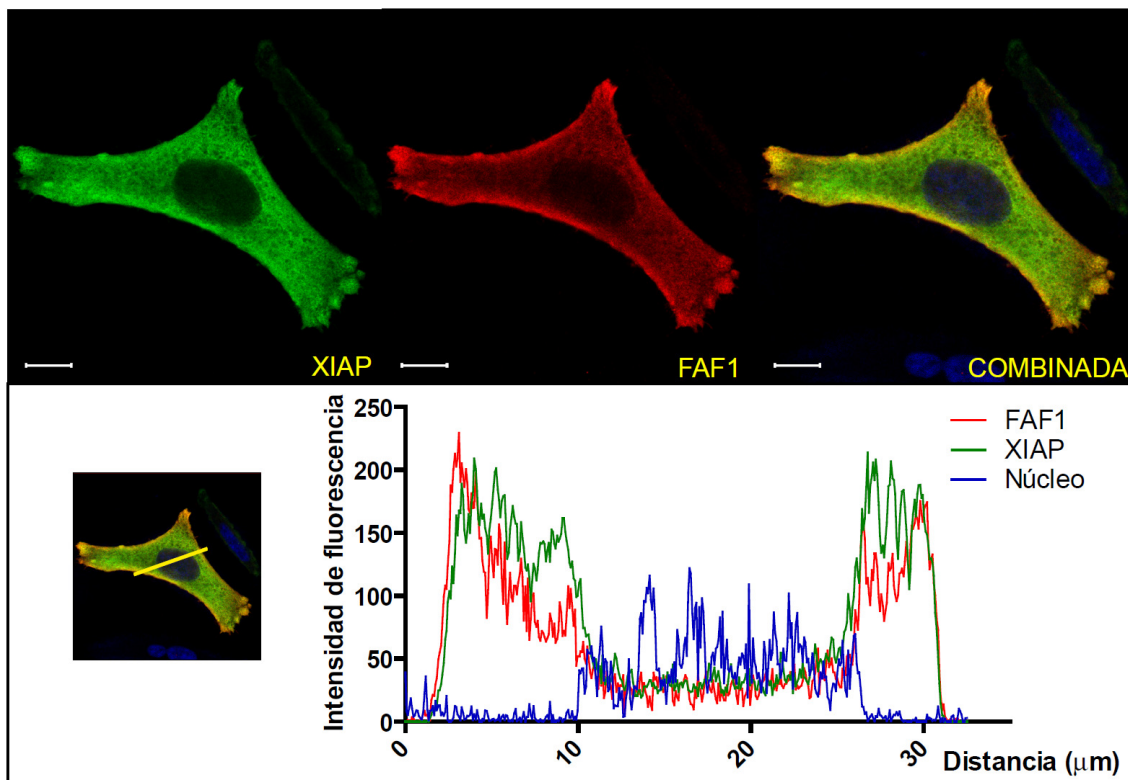


Figura R9. Colocalización de las proteínas sobreexpresadas FAF1 y XIAP en células HeLa. Panel superior, Ensayo de inmunocitoquímica en cultivos celulares HeLa que expresaron transitoriamente las proteínas de fusión HA-FAF1 y c-myc-XIAP, utilizando los anticuerpos anti-HA(FAF1) y anti-c-myc (XIAP) y el colorante fluorescente DAPI para la tinción del núcleo. La barra inferior indica la escala de 10 μm . El gráfico inferior es un gráfico de intensidades del corte axial de la célula (línea amarilla) en el que la línea azul indica el valor de intensidad de fluorescencia por píxel para el marcador nuclear DAPI. La línea verde indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína c-myc-XIAP y la línea roja indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína HA-FAF1.

Para analizar las imágenes obtenidas realizamos un estudio de colocalización cuantitativa utilizando el software libre de análisis de imagen ImageJ (NIH-MacBiophotonics). Procesamos las imágenes y calculamos diferentes coeficientes de colocalización mediante el plugIn Jacop (Bolte and Cordelieres 2006) del programa ImageJ, según detallamos en materiales y métodos, apartado 5.11.

COEFICIENTE		Colocalización FAF1-XIAP	Colocalización FAF1-GFP
Coefficiente de correlación de Pearson (Pr)	$R_p = \frac{\sum (R_i - \bar{R}) \times (V_i - \bar{V})}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R})^2 \times \sum (V_i - \bar{V})^2}}$	0,837 ± 0,164	0,568 ± 0,101
Coefficiente de solapamiento de Manders (R)	$R = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sqrt{\sum (R_i)^2 \times \sum (V_i)^2}}$	0,899 ± 0,075	0,627 ± 0,080
Coefficientes de colocalización M1 (FAF1)	$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i}$	0,846 ± 0,113	0,518 ± 0,165
Coefficientes de colocalización M2 (XIAP/GFP)	$M_2 = \frac{\sum V_{i,coloc}}{\sum V_i}$	0,918 ± 0,095	0,794 ± 0,152
Coefficiente de solapamiento k1 (FAF1)	$k_1 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (R_i)^2}$	0,818 ± 0,196	0,874 ± 0,070
Coefficiente de solapamiento k2 (XIAP/GFP)	$k_2 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (V_i)^2}$	0,987 ± 0,194	0,849 ± 0,085

Tabla R2. Colocalización cuantitativa de las proteínas FAF1 y XIAP en células HeLa. Calculamos los valores de diferentes coeficientes a partir de las imágenes de inmunofluorescencia (Figura R9) de células HeLa que sobreexpresaron transitoriamente las proteínas c-myc-XIAP y HA-FAF1. Como control hallamos los valores de los mismos coeficientes para las proteínas HA-FAF1 y GFP. Cada valor mostrado es la media de los coeficientes obtenidos en ~30 células en 3 experimentos independientes. El error expresado es la desviación estándar de los valores obtenidos. Los valores de los coeficientes de colocalización para las proteínas FAF1-XIAP son mayores que los coeficientes obtenidos para las proteínas control FAF1-GFP

La tabla R2 muestra los valores de los coeficientes de colocalización obtenidos para el inmunomarcaje de las proteínas sobreexpresadas HA-FAF1 y c-myc-XIAP, así como los valores hallados para las células control que sobreexpresaron HA-FAF1 y GFP. Los coeficientes de solapamiento de Manders(R) (0,899 ± 0,075; n=34) y de correlación de Pearson(Pr) (0,837 ± 0,164; n=34) indican un solapamiento entre el inmunomarcaje de FAF1 y XIAP cercano a 1 (100% de solapamiento) y con unos valores superiores a los obtenidos entre FAF1 y GFP (R: 0,627 ± 0,08; n=31 y Pr: 0,568 ± 0,101; n=31). La diferencia de valores obtenida en los coeficientes de solapamiento k1/k2 para las proteínas FAF1 y XIAP indica que XIAP tiene una mayor contribución (k2=0,987) a la colocalización que FAF1 (k1=0,818), reflejo de su mayor expresión global en las áreas de colocalización, como se aprecia en la figura R10.

Conocida la distribución y solapamiento de ambas proteínas cuando son sobreexpresadas, estudiamos la colocalización de las proteínas endógenas FAF1 y XIAP para confirmar si dicha interacción se produce en condiciones nativas. Realizamos un ensayo de inmunocitoquímica con cultivos de células HeLa utilizando anticuerpos monoclonales específicos de las proteínas endógenas FAF1 y XIAP, o FAF1 y β -tubulina, como control. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran la colocalización de ambas proteínas principalmente en el citoplasma (Figura R10).

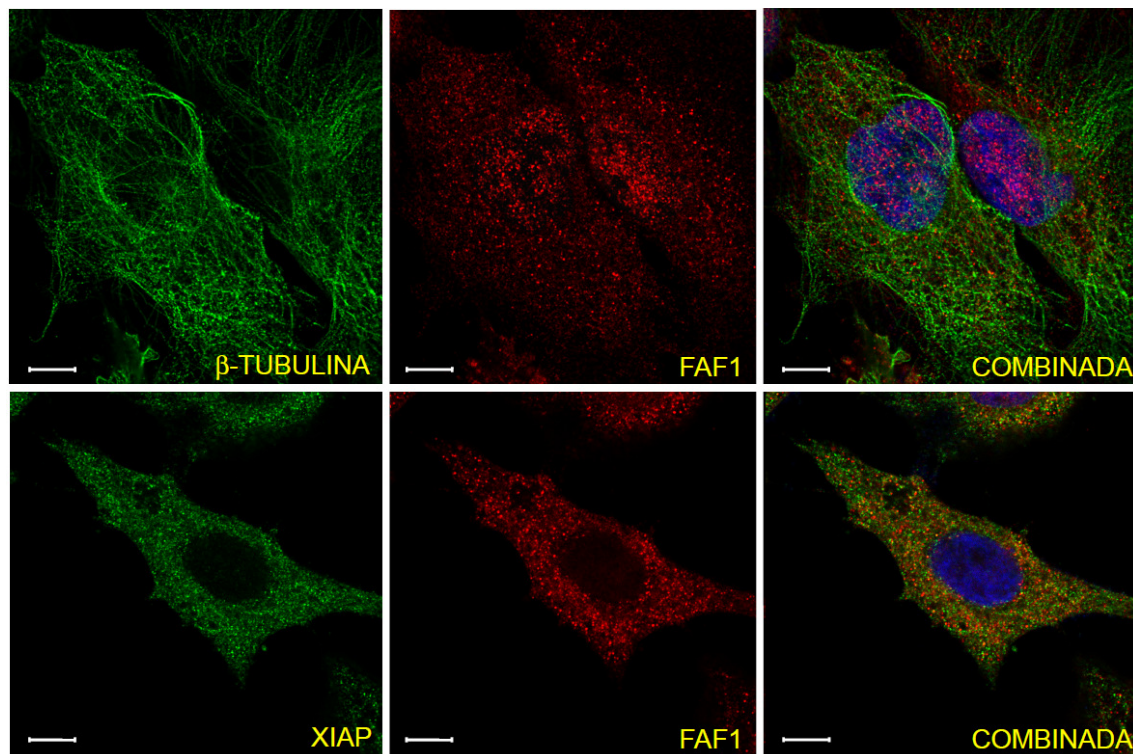


Figura R10. Colocalización de las proteínas FAF1 y XIAP endógenas en células HeLa. Ensayo de inmunocitoquímica en cultivos celulares HeLa, utilizando los anticuerpos anti-FAF1 y anti-XIAP o anti- β -tubulina como control. Para la tinción del núcleo utilizamos el colorante fluorescente DAPI. La barra inferior indica la escala de 10 μ m.

Con estas imágenes llevamos a cabo estudios de colocalización cuantitativa para las proteínas endógenas estudiadas (Tabla R3) según los métodos descritos anteriormente. Para cada par de imágenes se obtuvo también la significancia del valor del índice de Pearson mediante los tests de colocalización: Randomización de Costes y Función de correlación cruzada de Van Steensel. Ambos tests comparan el índice de Pearson de cada par de imágenes con imágenes modificadas de la original, dando como resultado que los valores obtenidos del índice de Pearson no son debidos al solapamiento

aleatorio de señales de inmunomarcaje en ambos canales. Tanto los coeficientes generales de colocalización (Pr y R) como los coeficientes disgregados por canales (M1/M2 y k1/k2) muestran unos valores superiores en el caso de las proteínas FAF1 y XIAP, en comparación a los valores entre FAF1 y la proteína control β -tubulina (Ver Tabla R3). Los índices k1 y k2 muestran que la contribución de FAF1 ($k_1=0,727$) a la colocalización es superior a la contribución de XIAP ($k_2=0,589$).

COEFICIENTE		Colocalización FAF1-XIAP	Colocalización FAF1- β -tubulina
Coeficiente de correlación de Pearson (Pr)	$R_p = \frac{\sum (R_i - \bar{R}) \times (V_i - \bar{V})}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R})^2 \times \sum (V_i - \bar{V})^2}}$	0,467 \pm 0,127	0,294 \pm 0,156
Coeficiente de solapamiento de Manders (R)	$R = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sqrt{\sum (R_i)^2 \times \sum (V_i)^2}}$	0,613 \pm 0,051	0,491 \pm 0,077
Coeficientes de colocalización M1 (FAF1)	$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i}$	0,966 \pm 0,024	0,881 \pm 0,108
Coeficientes de colocalización M2 (XIAP/GFP)	$M_2 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum V_i}$	0,943 \pm 0,028	0,884 \pm 0,068
Coeficiente de solapamiento k1 (FAF1)	$k_1 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (R_i)^2}$	0,727 \pm 0,278	0,405 \pm 0,127
Coeficiente de solapamiento k2 (XIAP/GFP)	$k_2 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (V_i)^2}$	0,589 \pm 0,179	0,632 \pm 0,178

Tabla R3. Análisis de la colocalización cuantitativa de las proteínas FAF1 y XIAP endógenas en células HeLa. Calculamos los valores de diferentes coeficientes a partir de las imágenes de inmunofluorescencia de células HeLa (Figura R10). Como control hallamos los valores de los mismos índices para las proteínas FAF1 y β -tubulina. Cada valor es la media de los valores obtenidos en ~10 células en 2 experimentos independientes. El error expresado es la desviación estándar de los valores obtenidos. Los valores de los coeficientes de colocalización para las proteínas FAF1-XIAP son mayores que los coeficientes obtenidos para las proteínas control FAF1- β -tubulina

En conjunto, el análisis de los ensayos de inmunocitoquímica revela que ambas proteínas muestran un comarcaje solapado en todo el citoplasma, y que la sobreexpresión de FAF1 y XIAP, provoca una deslocalización de FAF1, con una mayor intensidad en la membrana plasmática y menor en el citoplasma.

6.4 DEGRADACIÓN DE FAF1 MEDIADA POR XIAP

XIAP se caracteriza tanto por sus dominios BIR como por los dominios implicados en la ubiquitinación UBA y RING. La presencia de estos dominios dota a esta proteína de su actividad E3 ubiquitina ligasa (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008) mediante el que varias proteínas implicadas mayoritariamente en procesos apoptóticos son ubiquitinadas por XIAP como Smac/Diablo, Casapasas (Morizane, Honda et al. 2005), (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001). Omi/StrA2 (Yang, Xing et al. 2005), SIVA1 (Resch, Schichl et al. 2009), TAK1 (Kaur, Wang et al. 2005). A través de este mecanismo XIAP puede influir en otros procesos directa o indirectamente como autoregulación, regulación de apoptosis, regulación de NF- κ B (Galban and Duckett 2010).

Los ensayos realizados indican que XIAP bloquea a FAF1, pero los ensayos en la vía de NF- κ B sugieren que la interacción solo atenúa el efecto de FAF1 por lo que pensamos que este último puede ser bloqueado por XIAP mediante otro mecanismo complementario, que podría ser la degradación mediante su actividad E3 ubiquitina ligasa. Para poder determinar si XIAP es capaz de regular la acción de FAF1 mediante el proceso degradativo iniciado por ubiquitinación, realizamos un primer análisis con cultivos de células HEK293T en los que sobreexpresamos cantidades crecientes de la proteína XIAP y determinamos la cantidad de proteína FAF1 endógena presente en células. En la imagen R11A observamos que las cantidades de FAF1 endógenos disminuyeron a medida que aumentamos la concentración de la proteína XIAP, demostrando una degradación dosis-dependiente de FAF1 en presencia de XIAP.

Para complementar el estudio, determinamos si esta degradación se producía a través de la unión de ubiquitinas a FAF1 mediada por XIAP, para su posterior degradación en el proteosoma.

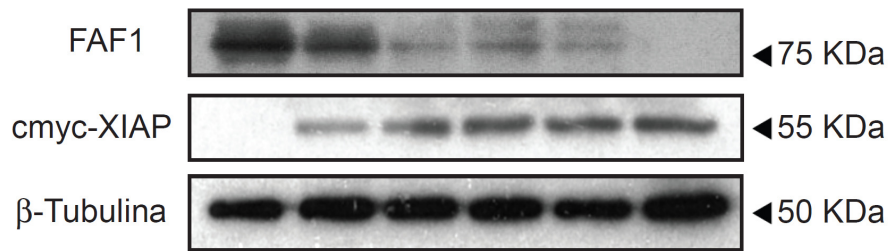
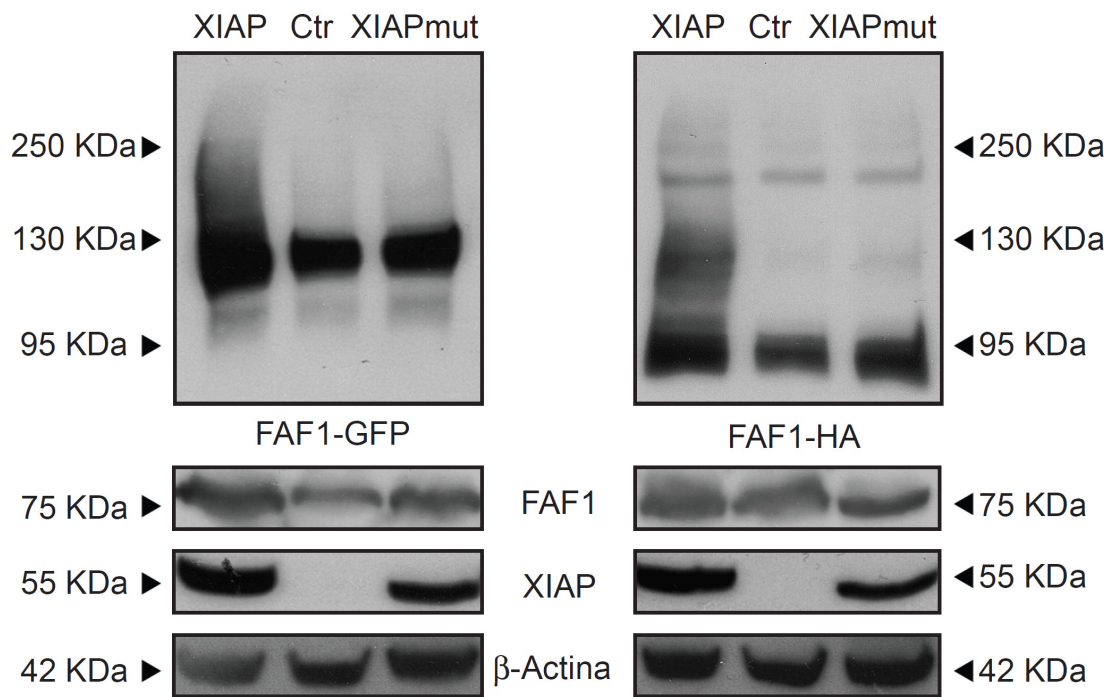
A**B**

Figura R11. Ubiquitinación de la proteína FAF1 en presencia de la proteína XIAP. A) Disminución de cantidad de la proteína FAF1 endógena en presencia de XIAP. Transfectamos cultivos de células HEK293T con cantidades crecientes del vector de expresión para la proteína de fusión c-myc-XIAP (0,1,2,4,6 y 8 $\mu\text{g/ml}$) durante 36 horas, y obtuvimos extractos celulares y los analizamos mediante western-blot utilizando anticuerpos específicos frente a tubulina, FAF1 y c-myc(XIAP). B) La proteína FAF1 es ubiquitinada en presencia de XIAP. Cotransfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para Ubiquitina, XIAP, XIAP- Δ RING (XIAPmut) y FAF1-EGFP (panel izquierdo) o FAF1-HA (panel derecho) durante 36 horas. Realizamos una inmunoprecipitación en columnas de sefarosa (materiales y métodos, apartado 5.8) precipitando los complejos unidos a ubiquitina. Realizamos un inmunoblot de los complejos formados con anticuerpos específicos frente a los marcadores EGFP en el panel izquierdo, y HA en el panel derecho. La imagen muestra el bandedo característico a la ubiquitinación, en el carril donde la proteína XIAP nativa está presente.

Con este fin, realizamos dos ensayos de inmunoprecipitación en células HEK293T en los que sobreexpresamos la proteína FAF1 unida a diferentes marcadores moleculares: HA o GFP. Además, los cultivos sobreexpresaron las proteínas ubiquitina-

His y XIAP, su mutante de delección XIAP- Δ RING, o un plásmido control. Tratamos los cultivos durante 16 horas con el inhibidor de proteosoma Z-Leu-Leu-Leu-al y llevamos a cabo una purificación en columnas de Histidina. Posteriormente, resolvimos mediante *western-blot* frente a los marcadores moleculares unidos a FAF1.

En la figura R11B observamos que en presencia de XIAP nativo, GFP-FAF1 mostró un bandeo progresivo, debido a la presencia de distintas especies moleculares de FAF1 poliubiquitinado, pero no observamos este patrón al coexpresarse con el plásmido control o en presencia del mutante de XIAP que no contiene el dominio RING con la actividad E3 ubiquitin ligasa. La ubiquitinación presentó un bandeo continuo desde el peso molecular de FAF1-GFP hasta pesos moleculares mas altos según se van añadiendo His-ubiquitinas a la proteína FAF1. Este resultado se repitió con el marcador molecular HA, obteniendo un bandeo mas escalonado, desde el peso molecular de HA-FAF1 hasta pesos muy superiores debido a la unión progresiva de ubiquitinas. Estos resultados revelan a FAF1 como una nueva proteína objeto diana para el proceso de poliubiquitinación por XIAP, terminando con la degradación de FAF1 por el proteosoma.

6.5 PAPEL DE LA INTERACCIÓN XIAP-FAF1 EN LA MUERTE CELULAR

Numerosas proteínas que interaccionan con XIAP conducen al bloqueo de su actividad anti-apoptótica. Esta regulación se realiza mediante distintos mecanismos como la inhibición directa con Smac/Diablo o HtrA2/Omi, por el secuestro en compartimientos celulares, por ejemplo XAF1, capaz de redistribuir a XIAP desde el citoplasma al núcleo o mediante degradación, como se ha demostrado recientemente en el caso de la proteína ARTs (Introducción, apartado 3.4). Con el fin de investigar cual la implicación funcional de esta interacción en el proceso apoptótico, abordamos tanto el estudio de la acción de FAF1 sobre la función citoprotectora de XIAP, así como la acción de XIAP sobre la actividad pro-apoptótica de FAF1.

La proteína FAF1 induce la muerte celular en presencia o ausencia de señales apoptóticas externas en células BOSC23, Jurkat y en Hela (Introducción, apartado 3.5). Puesto que FAF1 colocaliza y se une a la región que contiene los dominios BIR de XIAP, esta interacción podría alterar la actividad citoprotectora de XIAP. Con el fin de

estudiar el efecto de FAF1 sobre la citoprotección de XIAP, realizamos un ensayo de viabilidad celular con colorantes vitales Hoechst 33342 y Calceína-AM en cultivos de la línea celular HeLa que sobreexpresan las proteínas FAF1 y XIAP, y empleamos el sistema automatizado de análisis por microscopía epifluorescente (GE INCell 1000 Analyzer) (figura R14).

Los cultivos celulares que sobreexpresaron XIAP mostraron un $173\% \pm 25$ de células con marcaje positivo para calceína (n=11, normalizado frente a control, 100%). Los cultivos que sobreexpresaron FAF1 presentaron unos valores ($104\% \pm 14$, n=11) similares al control según muestra la figura R12. Sin embargo, al observar los cultivos que sobreexpresaban FAF1, el número total de células adheridas era menor (~20%) comparada con el resto de los cultivos celulares. De igual modo, las células que sobreexpresaban FAF1 mostraron núcleos más condensados y morfología celular más redondeada (figura R14), indicando que las células estaban en proceso apoptótico, pero no suficientemente avanzado para que la membrana citoplasmática se vea afectada, suceso fundamental para la pérdida de la señal de calceína. (Gatti, Belletti et al. 1998).

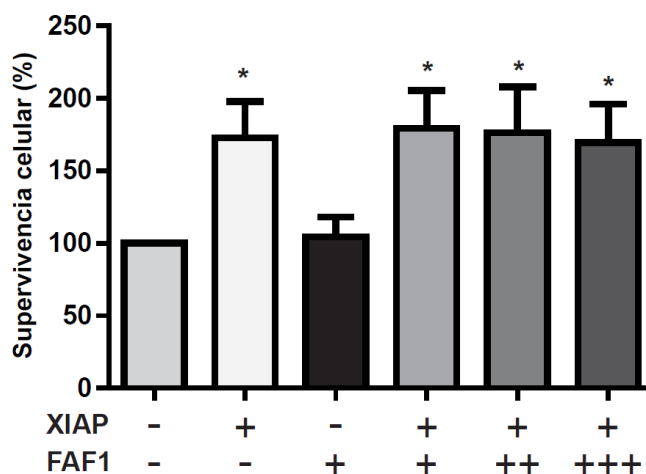


Figura R12: Interferencia de la proteína FAF1 sobre la función citoprotectora de la proteína. Cultivos celulares de la línea HeLa sobreexpresaron la proteína XIAP y concentraciones crecientes de la proteína FAF1. Las células se trataron con el colorante vital Calceína-AM y se analizaron con el microscopio automatizado GE-INCELL (apartado 5.13 de materiales y métodos). El gráfico muestra porcentajes de células con marcaje Calceína-AM positivo en cada condición. En la parte inferior se indica la sobreexpresión (+) de las proteínas FAF1 o XIAP en cada condición. Los valores están normalizados respecto al control. Cada condición se ha analizado en una media de 1500 células en 11 experimentos diferentes. ANOVA de 1 vía, $F(5,60):7.819$, $P<0,0001$). Test *Post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. $p^{**}<0,01$ frente al control. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

La viabilidad observada fue similar para los cultivos que sobreexpresaban tanto XIAP ($173\% \pm 25$, $n=11$) como XIAP con concentraciones crecientes de FAF1 (XIAP:FAF1 ratios 1:1, 1:2 y 1:3; con valores $179\% \pm 26$, $176\% \pm 31$ y $170\% \pm 26$ respectivamente, $n=11$). Todos estos valores fueron significativamente diferentes al control ($p<0,01$, Test *Post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni $t=3,838$ para XIAP vs control, $t=4,191$ para XIAP:FAF1 vs control, $t=4,023$ para XIAP:2(FAF1) y $t=3,665$ para XIAP:3(FAF1) vs control). Por tanto, estos resultados indican que la sobreexpresión de FAF1 no induce la muerte celular en los cultivos celulares y tampoco es capaz de alterar la actividad citoprotectora de XIAP (figura R12).

Seguidamente realizamos el mismo análisis sometiendo los cultivos a condiciones apoptóticas, incubando los cultivos con estaurosporina $12,5$ nM durante 18 horas. En este contexto desfavorable los cultivos celulares que sobreexpresaban XIAP mostraban un porcentaje de células calceína positivas superior al control ($260\% \pm 61$, $n=9$ normalizado frente al control) y respecto a los cultivos que sobreexpresaban FAF1 ($131\% \pm 14$, $n=9$) (figura R13). Estos cultivos que sobreexpresaban FAF1 tuvieron un número de células calceína positivas similar al control ($p>0,05$, $t=0,645$, $n=9$). Por otra parte, la sobreexpresión de XIAP y FAF1 en diferentes ratios de concentración (1:1, 1:2 y 1:3) mantuvo porcentajes de células calceína positivas similares a los cultivos celulares que sobreexpresaban XIAP únicamente ($314\% \pm 90$ para ratio 1:1, $253\% \pm 59$ para ratio 1:2, $225\% \pm 55$ para ratio 1:3, $n=9$ para cada valor). Sin embargo, cuando aumentamos la concentración de la proteína FAF1 hasta un ratio 1:3 en relación a la concentración de la proteína XIAP, los valores de intensidad de calceína dejaron de ser significativamente diferentes al control.

En conjunto estos resultado muestran que tras la inducción de la muerte celular, la sobreexpresión de XIAP favorecen la supervivencia, la sobreexpresión de FAF1 no aumenta la muerte, pero sí atenúa el efecto citoprotector de XIAP en un ratio 1:3 (Figura R15).

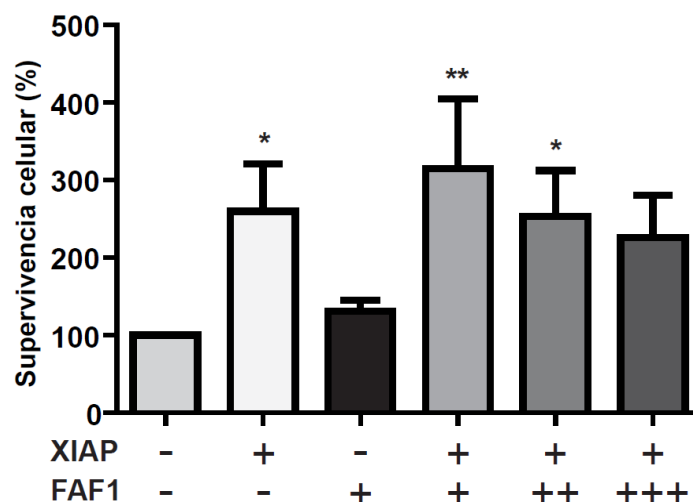


Figura R13. Interferencia de la proteína FAF1 en la función citoprotectora de la proteína XIAP en células apoptóticas. Cultivos de células de la línea HeLa que sobreexpresaron la proteína XIAP y concentraciones crecientes de la proteína FAF1 fueron estimulados con Staurosporina 12,5 nM durante 18 horas. Las células se incubaron con calceína-AM y Hoechst-33342. Los cultivos se analizaron con el microscopio automatizado GE-INCELL (apartado 5.13 de materiales y métodos). Los valores de Intensidad de calceína se expresan en porcentaje de células con marcaje Calceína-AM positivo respecto al control. En la parte inferior se indica la sobreexpresión (+) de las proteínas FAF1 o XIAP en cada condición. Cada condición se ha analizado en una media de 15000 células en 9 experimentos diferentes. ANOVA de 1 vía, $F(5, 48):5,748$, $P<0,0001$). Test *Post hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. $p^*<0,05$ frente a control, $p^{**}<0,01$ frente al control). Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM).

Estos ensayos solo utilizan las diferencias en el marcaje del colorante vital Calceína para determinar la viabilidad celular. Con el fin de analizar con mayor precisión el proceso de muerte celular estudiamos los cambios morfológicos que acontecen en la célula. Para este fin, mediante un análisis de imagen celular analizamos datos de la intensidad de calceína, área de la célula, forma de la célula, intensidad del núcleo, área del núcleo, forma del núcleo y coeficiente de variación de la intensidad del núcleo (materiales y métodos, apartado 5.13).

Mediante los datos obtenidos dividimos las células en 4 poblaciones: células positivas en calceína con el núcleo no condensado (células sanas), células positivas en calceína con el núcleo condensado y células negativas en calceína con el núcleo no condensado (células en muerte celular temprana), y células negativas en calceína con el núcleo condensado (células apoptóticas).

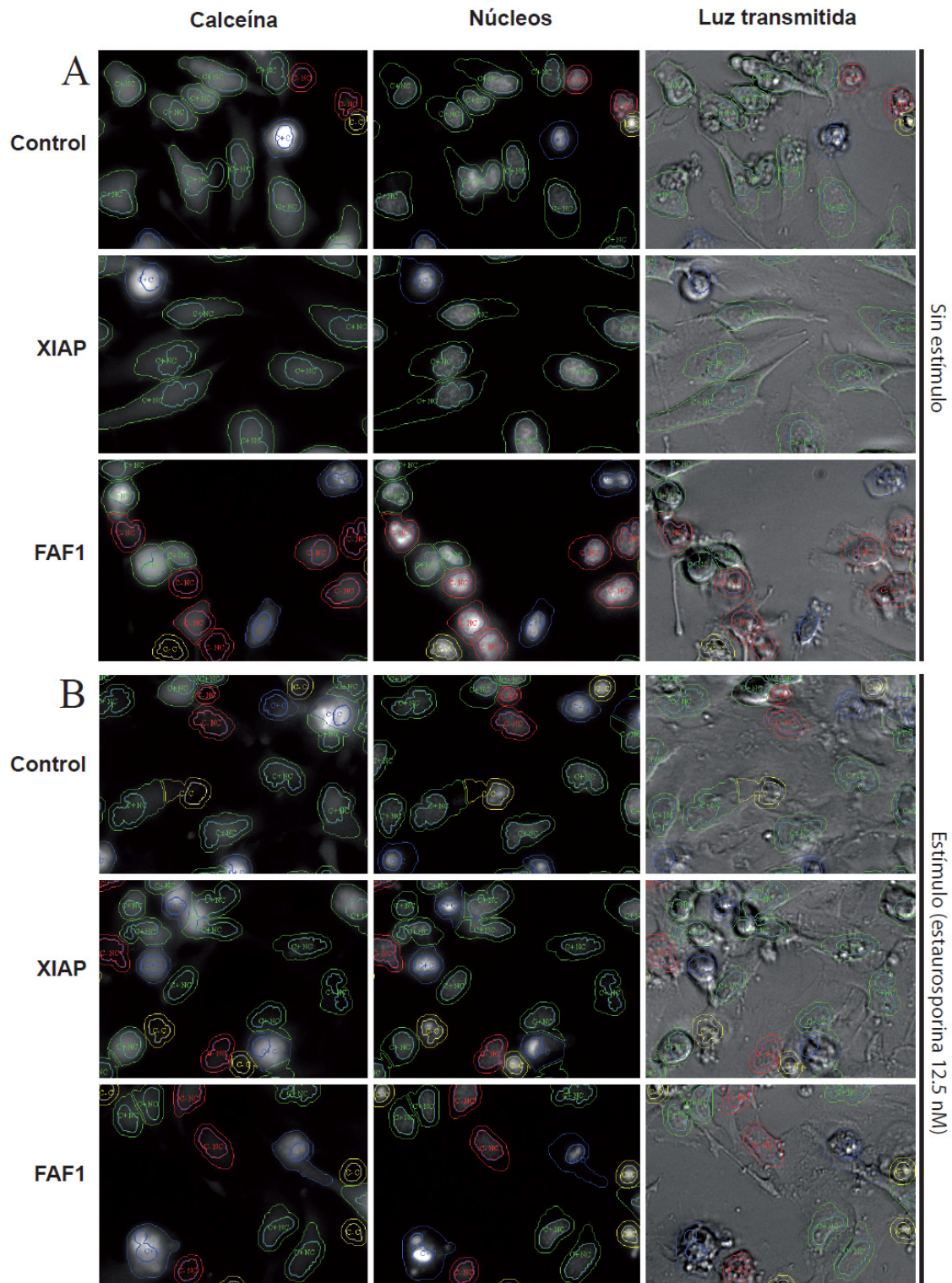


Figura R14. Análisis de imagen automatizado en cultivos de células HeLa. Imágenes representativas de los cultivos de células HeLa que sobreexpresaban las proteínas FAF1 o XIAP no estimuladas (A) y estimuladas con estaurosporina 12,5 nM durante 18 horas (B). Tratamos las células con el colorante vital Calceína-AM y el marcador nuclear Hoechst-33342 y realizamos un análisis de imagen con el sistema automatizado GE-INCELL. Las células se clasificaron en cuatro poblaciones atendiendo a la Intensidad de Calceína (C+ y C-) y a la condensación del núcleo (C y NC). En las imágenes distinguimos las poblaciones según los colores verde (C+,NC), azul (C+, C), amarillo (C-, C) y rojo (C-, NC). Tanto el panel la línea superior de los paneles. Todas las imágenes muestran la máscara de análisis de supervivencia superpuesta. Las imágenes mostradas son muestras de los ~450 campos analizados.

Utilizando estos parámetros, evaluamos el porcentaje de células vivas atendiendo a los filtros creados. Analizamos un número aproximado de 5000 células por cada población. En todos los casos en los que XIAP estaba sobreexpresado, el porcentaje de la población de células sanas se vió aumentado respecto al cultivo control. (XIAP: + 10,9%, XIAP:FAF1: + 13,9 %, XIAP:2(FAF1): + 9,7% y XIAP:3(FAF1): 7,93%). Sin embargo, continuó sin reflejarse la acción apoptótica de la proteína FAF1, registrando unos valores de muerte similares al control (- 0,03%). Los cultivos en los que la proteína FAF1 estaba cotransfetada con XIAP en ratios 1:2 y 1:3, presentaban una ligera disminución del porcentaje de células vivas respecto a los cultivos transfectados solo con XIAP. Con objeto de un estudio pormenorizado de estas poblaciones llevamos a cabo un análisis de componentes principales (ACP) (materiales y métodos, apartado 5.13)

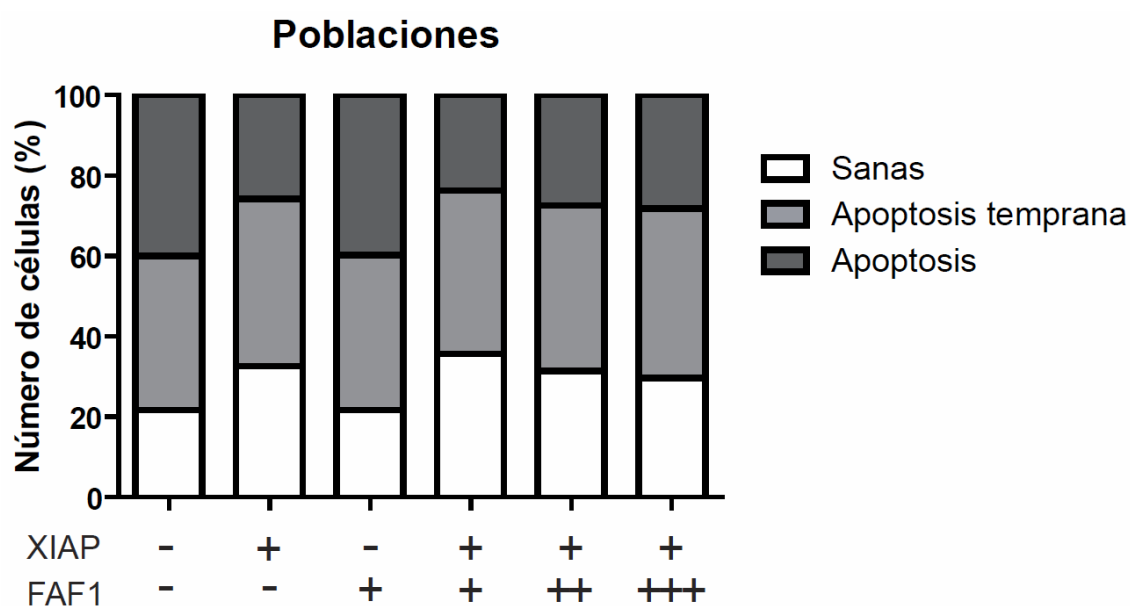


Figura R15. : Interferencia de la proteína FAF1 en la función citoprotectora de la proteína XIAP en células apoptóticas. Distribución de poblaciones celulares. Sobreexpresamos la proteína XIAP y concentraciones crecientes de la proteína FAF1 en cultivos de células humanas HeLa. Estimulamos con estaurosporina 12,5 nM durante 18 horas. Incubamos las células con calceína-AM y Hoechst-33342. Analizamos los cultivos con el microscopio automatizado GE-INCELL. Separamos las poblaciones celulares atendiendo a los filtros creados mediante el software INCELL con los datos de Intensidad de Calceína (Calceína +/-) y de morfología nuclear (Núcleo condensado /No condensado). Las barras indican el porcentaje de células perteneciente a cada población en cada uno de los casos estudiados. Hemos evaluado 5000 células de 3 experimentos diferentes.

El análisis de los datos muestra una distribución gradual de la variabilidad entre las 7 componentes (Tabla R4). Las 5 primeras componentes absorben más del 90% de la variabilidad total de los datos, razón por la cual las hemos seleccionado para evaluarlas.

El estudio de las contribuciones de las variables originales a estas componentes (vectores propios o eigenvectors, Tabla R4) muestra que dos componentes, la primera y la quinta, tienen combinaciones de variables que podrían separar las células según su estado apoptótico.

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES								
Valores Propios		Comp 1	Comp 2	Comp 3	Comp 4	Comp 5	Comp 6	Comp 7
	Eigen value	2,4	1,55	1,16	0,8	0,56	0,34	0,19
	% varianza	34,29	22,16	16,58	11,47	7,91	4,78	2,81
Vectores propios	AREA NÚCLEO	0,71	0,343	0,271	0,323	-0,348		
	FORMA NÚCLEO	0,692	-0,02	0,243	0,424	0,522		
	INTENSIDAD NÚCLEO	-0,534	0,746	0,103	0,184	0,031		
	Coef Var NÚCLEO	-0,692	0,543	-0,175	0,261	0,135		
	AREA CÉLULA	0,653	0,566	-0,222	-0,113	-0,209		
	INTENSIDAD CÉLULA	0,037	0,383	0,718	-0,55	0,161		
	FORMA CÉLULA	0,474	0,338	-0,65	-0,317	0,267		

Tabla R4. Análisis de Componentes Principales. Valores propios (eigenvalues) y vectores propios (eigenvectors) del análisis de componentes principales realizado con los valores de las 7 variables cuantificadas mediante el sistema automatizado de microscopía de fluorescencia InCell. El ACP genera combinaciones lineales de las variables originales que dan como resultado las denominadas componentes principales, variables ortogonales que recogen la máxima variabilidad restante. Cada fila del vector propio indica la contribución de las variables originales a las 5 primeras componentes principales.

La primera separa aquellas células grandes, con forma irregular y núcleos irregulares y grandes de las células con núcleos con intensidad alta y variable (heterogéneos), que corresponderían a células no apoptóticas y apoptóticas respectivamente. La quinta componente por su parte separa células con núcleo grande en células grandes (propios de células no apoptóticas) frente a células con núcleos irregulares en células irregulares (posiblemente asociados a procesos de apoptosis). Los valores medios de ambas componentes mostraban diferencias marcadas entre los cultivos tratados con XIAP (bajos niveles de muerte celular) frente a los tratados con estaurosporina y FAF1 (máximos niveles de muerte celular). Para evaluar como afectan los tratamientos a las poblaciones de acuerdo con estas dos componentes, dividimos las células en 2 subpoblaciones según cada componente (positivas y negativas). Por combinación de las dos componentes se generaron en total 4 categorías, una que

combina las células no apoptóticas de ambas componentes, que consideramos como las células sanas y otras 3 con diferentes combinaciones de más difícil interpretación. La figura R16 muestra que la sobreexpresión de XIAP aumenta la población de células sanas (+ 5,4 % respecto a control). Por su parte, la sobreexpresión de FAF1 no muestra una alteración en el número de células sanas respecto al control ni en concentraciones crecientes coexpresado con XIAP (22%, 20,8% y 20,9% respecto a 20,9% de XIAP sólo).

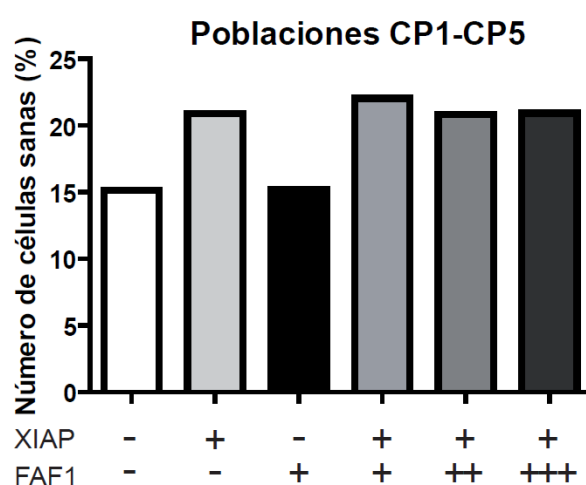


Figura R16. Porcentaje de células vivas según la componente principal 1 y 5. Sobreexpresamos la proteína XIAP y concentraciones crecientes de la proteína FAF1 en cultivos de células de la línea HeLa. Estimulamos con estaurosporina 12,5 nM durante 18 horas e incubamos los cultivos con calceína-AM y Hoechst-33342. Analizamos los cultivos con el microscopio automatizado GE-INCELL. La gráfica indica el porcentaje de células sanas según el valor de la componente principal 1 y 5 (Tabla R4). La población representada está compuesta por células grandes, con forma irregular y núcleos grandes e irregulares. Células evaluadas: ~ 30000.

Si bien estos ensayos no señalan un posible efecto de la sobreexpresión de FAF1 sobre la acción citoprotectora de XIAP, no podemos excluir la pérdida de una parte de la población celular debida a los efectos de la sobreexpresión de FAF1, ya que las células en proceso apoptótico se desprenden de la superficie de crecimiento o se colocan en un plano de enfoque ligeramente superior al de las células sanas.

Con el fin de confirmar si la sobreexpresión de FAF1 altera la citoprotección debida a XIAP, llevamos a cabo un análisis complementario mediante citometría de flujo. De esta manera quedó incluida en el estudio toda la población celular adherida y la no adherida a la superficie de cultivo. Para este análisis, indujimos la sobreexpresión de

FAF1, XIAP o XIAP + FAF1 en cultivos celulares, que estimulamos con o sin estaurosporina a una concentración de 10 nM durante 24 horas antes de ser analizados.

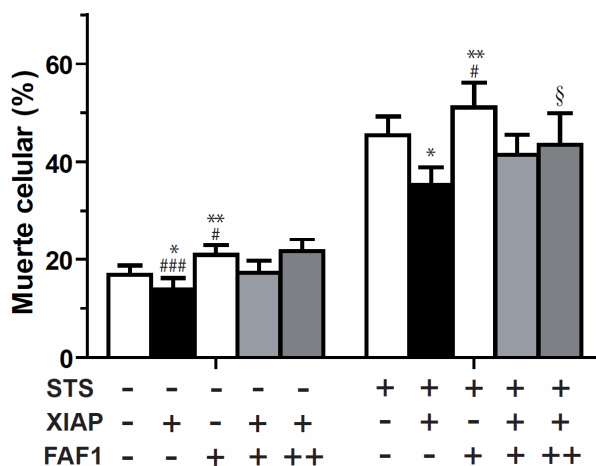


Figura R17. Interferencia de la proteína FAF1 en la citoprotección de la proteína XIAP en células HEK293T durante el proceso apoptótico. Cultivos celulares de la línea HEK293T sobreexpresaron las proteínas XIAP y FAF1 en diferentes concentraciones. Los cultivos fueron estimulados con o sin estaurosporina(STS) 10 nM durante 18 horas. Las células se marcaron con el colorante nuclear DAPI y el porcentaje de muerte celular fue evaluado por cuantificación de la población en el estado sub G0/G1 medido mediante citometría de flujo (apartado 5.14 de materiales y métodos). El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student de 1 o 2 colas según los tratamientos comparados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente a control. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ frente a XIAP+FAF1, § $p < 0,05$ frente a XIAP. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos.

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de FAF1 provoca un aumento significativo de la muerte celular respecto a células control, tanto en cultivos no estimulados ($p < 0,05$, $T_7 = 4,597$, $n = 8$; Valor FAF1: $20,84\% \pm 1,99$. Valor control: $16,83\% \pm 1,9$) como estimulados ($p < 0,05$ $T_4 = 2,779$ $n = 5$. Valor FAF1: $51,085\% \pm 5,052$. Valor control: $45,37\% \pm 3,883$), indicando que altas concentraciones del factor FAF1 son capaces de aumentar la muerte celular sin necesidad de estímulo externo.

Cuando estimulamos los cultivos con el agente citotóxico estaurosporina, la sobreexpresión de FAF1 junto con XIAP no mostró diferencias estadísticas frente a los valores de citoprotección obtenidos con XIAP. Sin embargo, la transfección de FAF1 junto con XIAP en proporción 2:1 (FAF1:XIAP) en células estimuladas, atenuó significativamente la citoprotección de XIAP y aumentó ligeramente el porcentaje de células muertas hasta los niveles del cultivo control ($43,45\% \pm 6,45$; $n = 3$ para FAF1:XIAP (2:1) y $45,37\% \pm 3,883$, $n = 6$ para el cultivo control).

Estos datos obtenidos por citometría y por el analizador celular INCELL nos indican que la citoprotección de XIAP no se ve alterada por FAF1, aunque transfecciones elevadas de FAF1 atenuan la citoprotección de XIAP. Sin embargo, al evaluar el proceso de muerte con estas dos metodologías observamos que perdíamos información tanto por el desprendimiento de las células de la superficie de cultivo como por la heterogeneidad de los niveles de expresión de ambas proteínas cuando son sobreexpresadas conjuntamente. Para resolver estas limitaciones iniciamos un estudio alternativo, analizando la muerte celular por observación directa mediante microscopía de epifluorescencia. Para ello, cuantificamos la supervivencia evaluando visualmente la morfología nuclear de células HeLa transfectadas con los plásmidos EGFP (control) o EGFP-FAF1 en presencia o ausencia de la proteína sobreexpresada XIAP. En este estudio empleamos como estímulo apoptótico un anticuerpo contra Fas/CD95, que actúa como agonista del receptor Fas/CD95 en la que participa directamente FAF1.

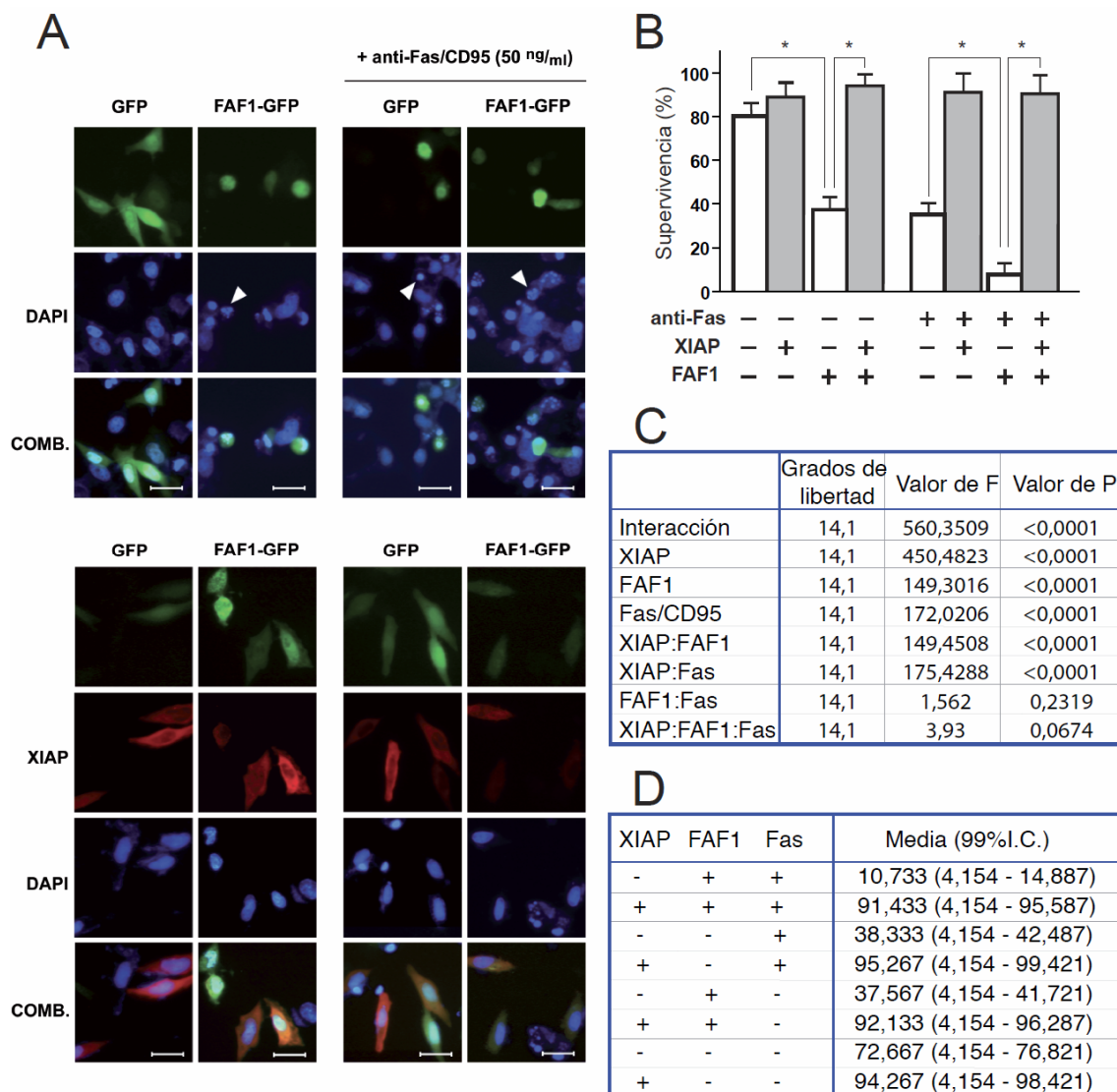


Figura R18. Interferencia entre las proteínas XIAP y FAF1 durante la muerte celular. **A.** Imágenes de células HeLa con sobreexpresión de c-myc-XIAP, GFP-FAF1 o GFP (control) con y sin estimulación con anti-CD95/Fas (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μM) durante 16 horas. Las puntas de flecha señalan núcleos picnóticos. Barra=20 μm. **B.** Cuantificación de la supervivencia celular (% de células con el núcleo no picnótico). * diferencias entre tratamientos superiores al intervalo de confianza de la media del 99% (p<0,01). **C.** El análisis estadístico ANOVA de 3 vías reveló diferencias significativas para el tratamiento con XIAP, FAF1 y Fas/CD95. **D.** Intervalos de confianza de las diferentes condiciones tras ajuste del modelo.

Para el análisis de estos experimentos, se cuantificó el porcentaje de células con núcleo no picnótico respecto al total de células como estimación de la supervivencia celular. Este valor se calculó a partir de un promedio de 254 células por condición y experimento que mostraron expresión de las proteínas transfectadas (EGFP-FAF1, EGFP o c-myc-XIAP). Los datos obtenidos (figura R18B) se analizaron mediante un ANOVA de tres vías, empleando como factores la transfección con XIAP, con FAF1 y la estimulación con anti-Fas/CD95 y los datos de 3 experimentos independientes (factor

aleatorio o bloque). Los resultados del análisis (Figura R18C) revelan efectos altamente significativos ($p < 0,001$) de la transfección con XIAP, con FAF1 o la estimulación con anti-Fas/CD95, así como los términos de interacción (estadística) entre la transfección con XIAP y la estimulación con Fas y entre la transfección con XIAP y con FAF1. La interpretación de estos términos de interacción indica que tanto la transfección de FAF1 como la estimulación con anti-Fas/CD95 tienen efectos que varían según las células se hayan transfectado o no con XIAP. El análisis detallado de las medias de las interacciones (y sus intervalos de confianza al 99%) permiten interpretar el efecto de los diferentes tratamientos. Así, la tabla presente en la figura (Figura R18D) muestra que las células transfectadas con EGFP-FAF1 presentaron un porcentaje de supervivencia celular menor que los controles transfectados con EGFP, tanto con o sin estimulación con Fas (37,6% frente a 72,3% sin estímulo; 10,7% frente a 38,3% con estimulación). Sin embargo, el efecto pro-apoptótico de FAF1 desapareció cuando se co-transfectó la proteína c-myc-XIAP (92,1% y 91,4% de supervivencia en ausencia y presencia de Fas, respectivamente), indicando que XIAP bloquea la muerte celular promovida por FAF1 en células HeLa independientemente de la estimulación de la vía Fas/CD95. De forma similar, la estimulación pro-apoptótica con el anticuerpo contra Fas/CD95 causa una reducción significativa de la supervivencia celular respecto a los controles sin estimular (38,3% frente a 72,3% respectivamente), que es completamente revertida al transfectar con XIAP las células estimuladas (95,3% de supervivencia) alcanzando valores incluso significativamente superiores a los de los controles sin estimulación (72,3%).

Como conclusión, los datos presentados en la presente sección demuestran que la proteína XIAP es capaz de bloquear la muerte celular iniciada por el receptor Fas/CD95 o por la sobreexpresión de FAF1, así como la acción conjunta de ambos factores. También demuestran que, por el contrario, la proteína FAF1 no tiene efecto sobre la función citoprotectora de XIAP.

6.5.1 Estudio de la activación de caspasas en el proceso apoptótico

Estudios anteriores han mostrado la relevancia de FAF1 en la formación del complejo de muerte celular DISC y en la transmisión de la señal de muerte celular

iniciada por Fas/CD95(Ryu, Lee et al. 2003). Para analizar la acción de XIAP en la muerte inducida por FAF1, estudiamos la señalización en la cascada apoptótica iniciada por el receptor Fas/CD95. Empleamos cultivos de células HeLa, en los que se sobreexpresaron de forma transitoria XIAP, FAF1 o ambas proteínas, incubándolos posteriormente en ausencia o presencia del estímulo apoptótico de la vía celular Fas/CD95. Empleamos los extractos celulares obtenidos para determinar los niveles de las proteínas: caspasa8, caspasa9, caspasa3, caspasa7 y PARP. Analizamos también los niveles de procesamiento de las caspasas 8 y 3, así como los niveles de los controles de expresión XIAP (c-myc), FAF1 (HA) y β -Actina.

Los extractos celulares de cultivos de células HeLa no estimulados (figura 19) presentaron diferencias en los niveles de caspasas 3, 7 y 8, así como de la proteína PARP. Los niveles de expresión de todas las formas pro-caspasas disminuyeron en los cultivos que sobreexpresaban FAF1, pero la caspasa iniciadora 9 no presentó diferencias apreciables. Los niveles de caspasa 8 procesada, indicados en la figura R19 con puntas de flecha blancas, disminuyeron cuando la proteína XIAP estaba sobreexpresada junto a FAF1, lo que indica que XIAP interfiere en la activación de caspasa 8 mediante su interacción con FAF1. Para conocer la acción de las caspasas efectoras, estudiamos el nivel de degradación proteolítica de su sustrato PARP. Los niveles de procesamiento de esta proteína se vieron aumentados solo en el cultivo celular que sobreexpresaba FAF1, indicando una mayor actividad de las caspasas efectoras 3 y 7. .

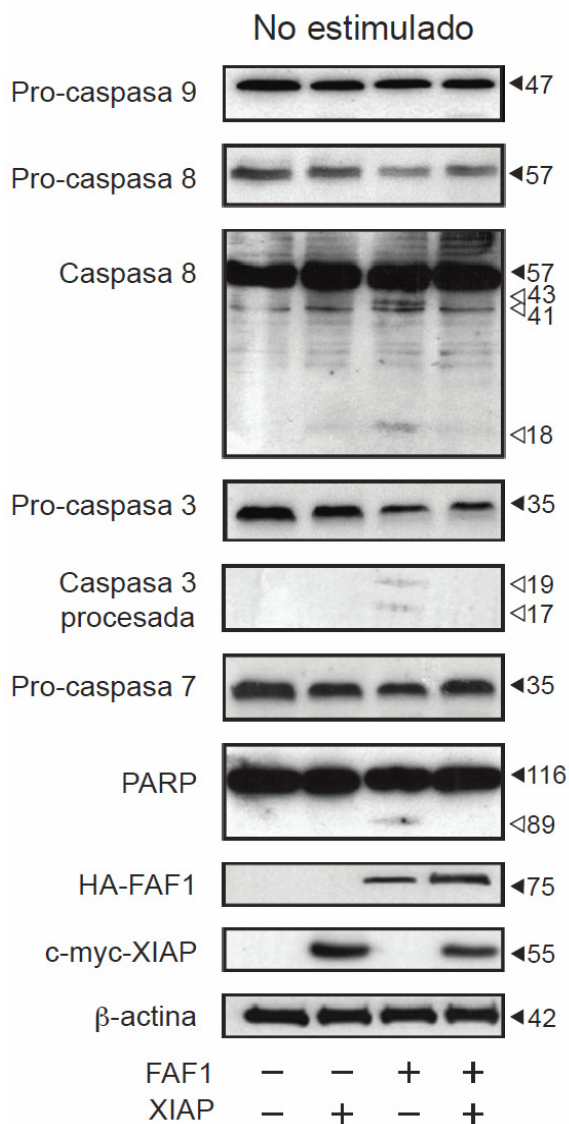


Figura R19. Interferencia de la proteína XIAP en la activación de caspasas promovida por la proteína FAF1. Transfectamos cultivos de células HeLa con los vectores de expresión para las proteínas XIAP, FAF1 o cotransfectamos con los vectores de expresión de ambas proteínas. Tras 24 horas, obtuvimos extractos celulares y analizamos distintos componentes de la vía apoptótica mediante inmunomarcado después de transferencia en geles de agarosa (materiales y métodos, apartado 5.5.4). Los paneles inferiores muestran los controles para las proteínas FAF1, XIAP y el control de carga β -Actina. Los paneles son imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Los triángulos blancos señalan los fragmentos procesados de las caspasas 8 y 3 y de la proteína PARP.

En los cultivos de células HeLa en los que estimulamos la vía Fas/CD95 (figura R20) observamos diferencias en la activación proteolítica de todas las caspasas estudiadas. En los extractos celulares obtenidos observamos un mayor procesamiento proteolítico de todas las formas pro-caspasa estudiadas, comparado con las condiciones sin estimular.

En los cultivos con FAF1 sobreexpresado, las formas inactivas de caspasas 8 y 9 mostraron menor cantidad que el control, debido al mayor procesamiento proteolítico. Igualmente, observamos un aumento en la cantidad de caspasa 8 procesada (forma activa). En línea con los resultados en las células no estimuladas, observamos que la coexpresión de XIAP y FAF1 mantuvo los niveles de pro-caspasa 8 y 9 similares al control, indicando que XIAP atenúa el procesamiento proteolítico de caspasa 8 debido a

FAF1. Sin embargo, al observar los niveles de caspasa 8 procesada, XIAP no es capaz de bloquear el procesamiento en presencia de FAF1.

Los niveles de procesamiento proteolítico de las caspasas efectoras 3 y 7 en cultivos que coexpresaban FAF1 y XIAP fueron similares a los del cultivo que sobreexpresaba XIAP solo, indicando una inhibición del procesamiento proteolítico de las caspasas efectoras. Sin embargo los niveles de las caspasas 3 procesadas muestran niveles similares en los cultivos que sobreexpresaron FAF1 y los que coexpresaron FAF1 y XIAP. El sustrato de caspasa 3 y 7, la proteína PARP, mostró un procesamiento proteolítico en todos los cultivos estudiados. Este procesamiento fue mayor en los cultivos que sobreexpresaban FAF1, pero notablemente disminuido en aquellos que coexpresaban XIAP y FAF1.

En conjunto, estos resultados muestran que en células no estimuladas FAF1 activa el procesamiento de las caspasas 3, 7 y 8 y este es bloqueado por XIAP. En células estimuladas a través del receptor Fas/CD95, el procesamiento proteolítico de las caspasas iniciadoras 8 y 9 y las efectoras 3 y 7 debido a la sobreexpresión de FAF1 es disminuido por la coexpresión con XIAP.

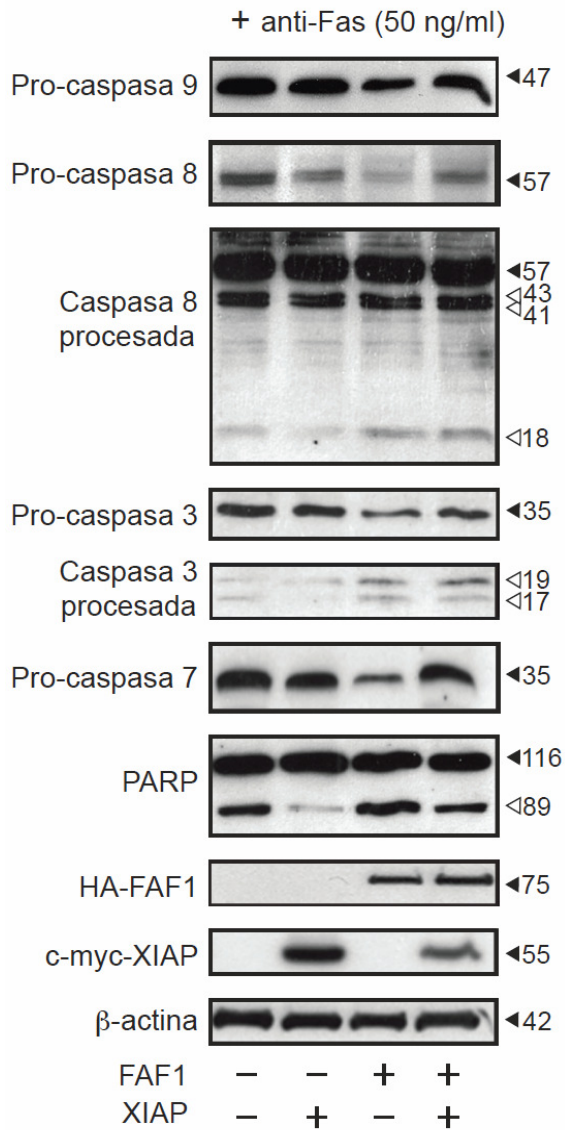


Figura R20. Interferencia de la proteína XIAP sobre la proteína FAF1 durante la muerte celular dependiente de caspasa activada por Fas/CD95. Transfectamos cultivos de células HeLa con los vectores de expresión para XIAP, FAF1 o XIAP + FAF1. Tras 24 horas, estimulamos los cultivos celulares con anti-Fas/CD95 (100µg/ml) y ciclohexamida (2,5 µM) durante 16 horas. Obtuvimos extractos celulares de los cultivos y analizaos distintos componentes de la vía apoptótica mediante inmunomarcado después de transferencia en geles de agarosa (materiales y métodos, apartado 5.5.4). Los paneles inferiores muestran los controles para las proteínas FAF1, XIAP y el control de carga β-actina. Los paneles son imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Los triángulos blancos señalan los fragmentos procesados de las caspasas 8 y 3 y la proteína PARP.

Los experimentos anteriores nos dieron información sobre los niveles de cantidad de procaspasas y caspasas activas presentes en la célula. Sin embargo, el procesamiento proteolítico de caspasas puede no ser suficiente para informar de la actividad enzimática de estas proteasas. Por este motivo abordamos un estudio de la actividad de estas caspasas en cultivos de células que sobreexpresaron XIAP y/o FAF1. Realizamos un ensayo de luminiscencia, en el que se proporciona un sustrato específico de caspasas. (materiales y métodos, apartado 5.10). En cultivos de células HeLa indujimos la sobreexpresión de las proteínas XIAP, FAF1 o ambas proteínas y cuantificamos la actividad de las caspasas 3,7 y 8 mediante luminiscencia. En ausencia de estímulo, observamos que la actividad de las caspasas 3 y 7 aumentó notablemente ($p < 0,01$,

T₂=10,36. n=3) en cultivos en los que sobreexpresamos FAF1, sin embargo, cuando las células coexpresaban XIAP la actividad de las caspasas 3 y 7 se vio bloqueada. Es interesante que la coexpresión del mutante truncado de XIAP (sin dominio RING) junto con FAF1 también fue capaz de bloquear la actividad de las caspasas 3 y 7 (figura R21).

A continuación realizamos el mismo experimento, estimulando la vía extrínseca de apoptosis a través del receptor Fas, utilizando el agonista anti-CD95/Fas. La actividad de las caspasas 3 y 7 se vio bloqueada por la sobreexpresión de XIAP ($p < 0,05$; T₄=4,223; n=5) y también en cultivos que coexpresaban XIAP y FAF1 a la misma concentración ($p < 0,05$; T₄=2,042; n=5) o el doble de FAF1 que de XIAP aunque en esta ocasión sin diferencias significativas con el control. Igualmente, estudiamos la actividad de la caspasa iniciadora 8 y si bien no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en la actividad de caspasa 8 entre todos los extractos celulares, pudimos apreciar como la actividad de caspasa 8 de los extractos celulares en los que sobreexpresamos FAF1, se encontraba mas elevada comparado con el resto de extractos celulares. Este incremento disminuía cuando los cultivos celulares sobreexpresaban también la proteína XIAP.

En conjunto estos resultados muestran que la sobreexpresión de la proteína FAF1 aumenta la actividad de las caspasas 3 y 7 tanto en células no estimuladas como en células estimuladas a través del receptor Fas/CD95. Este incremento de la actividad se ve disminuida por la presencia de la proteína XIAP. De igual forma, la activación de la caspasa iniciadora 8 inducida por la sobreexpresión de FAF1 se reduce en cultivos que coexpresan XIAP. Los datos obtenidos también sugieren que la proteína XIAP disminuye la actividad de caspasa 8 mediante su interacción con FAF1.

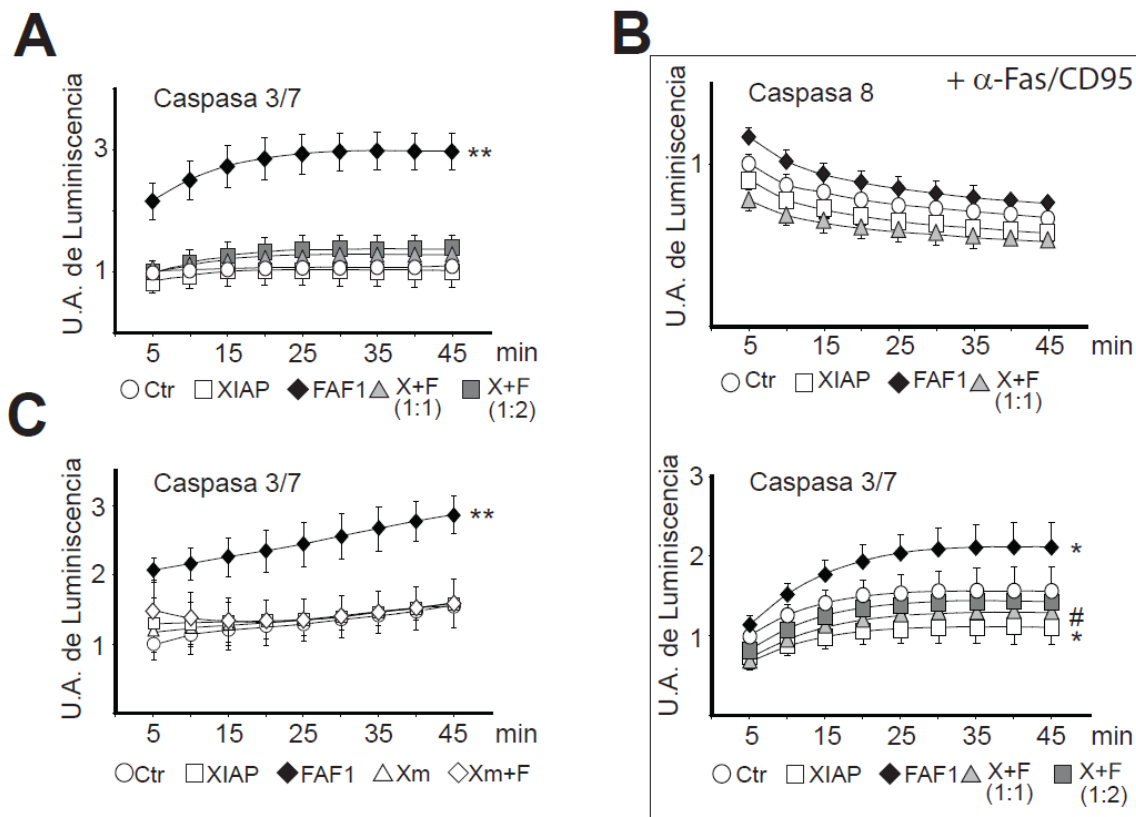


Figura R21. La proteína XIAP interfiere en la actividad de caspasas promovida por la proteína FAF1. Transfectamos cultivos de células HeLa con los vectores de expresión de XIAP, FAF1 o XIAP + FAF1 durante 24 horas y estimulados o no con anti-CD95/Fas (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μ M) durante 24 horas. Medimos la actividad de las caspasas 3/7 y 8 mediante kit comercial según el protocolo 5.12 de materiales y métodos. Los gráficos muestran el número de veces de activación de cada caspasa respecto al control (Unidades Arbitrarias de Luminiscencia) **A**) Transfectamos células HeLa con un plásmido control, y con los vectores de expresión para XIAP, FAF1 y la transfección conjunta de XIAP y FAF1 (X+F) en los ratios (1:1) y (1:2). Evaluamos la actividad de caspasa 3/7 en condiciones de no estimulación. Realizamos el análisis estadístico de los resultados mediante el test de t de Student, para los valores obtenidos al punto temporal de 25 minutos de cada estudio. Los valores mostrados son la media de n=3 experimentos. (**p<0.01 respecto al control) **B**) Transfectamos las células HeLa con un plásmido control y con los vectores de expresión para XIAP, FAF1 y la transfección conjunta de XIAP y FAF1 (X+F) en los ratios (1:1) o/y (1:2). Tras su estimulación con anti-Fas/CD95 y Chx evaluamos la actividad de caspasa 8 y caspasa 3/7. El análisis estadístico de los resultados lo hemos realizado mediante el test de t de Student, para los valores obtenidos al punto temporal de 25 minutos de cada estudio. Los valores mostrados son la media de n=3 experimentos. (*p<0,05 para XIAP comparada con el control y FAF1 comparado con el control, y #p<0,05 para XIAP+FAF1 comparado con FAF1). **C**) Transfectamos las células HeLa con los plásmidos control, XIAP, FAF1, el mutante XIAP- Δ RING (Xm) y la transfección conjunta del mutante XIAP- Δ RING y FAF1 (Xm+F). Tras su estimulación evaluamos la actividad de caspasa 3/7. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante el test de t de Student, para los valores obtenidos al punto temporal de 25 minutos de cada estudio. Los valores mostrados son la media de n=3 experimentos. (**p<0,01 comparado con el control).

6.5.2. Localización celular de las proteínas FAF1 y XIAP durante el proceso apoptótico

Durante el proceso apoptótico ambas proteínas participan en la vía de muerte celular, por lo que quisimos saber si la colocalización de ambas proteínas varía durante

este proceso. Hemos visto en el apartado anterior que FAF1 no es capaz de alterar la citoprotección de XIAP, sin embargo XIAP tiene un efecto inhibitorio sobre las funciones pro-apoptóticas de FAF1, por lo que nos preguntamos si también modifica su localización en la célula durante el proceso apoptótico. Para ello estimulamos cultivos de células HeLa con anti-CD95/Fas durante 4 horas activando así la vía apoptótica y realizamos un ensayo de inmunocitoquímica de las proteínas endógenas FAF1 y XIAP.

La imagen (figura R22) muestra que las proteínas FAF1 y XIAP endógenas se encuentran en todo el citoplasma durante el proceso apoptótico y no tienen un patrón de localización diferente al obtenido anteriormente en condiciones control (figura R10).

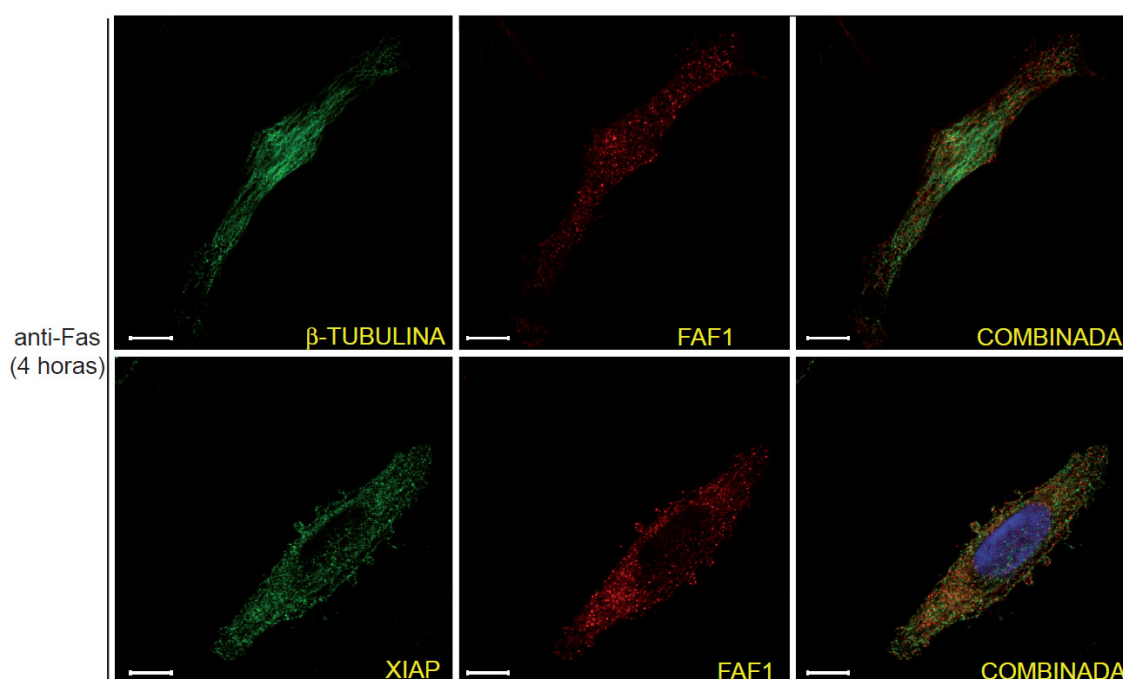


Figura R22. Colocalización de las proteínas endógenas XIAP y FAF1 durante el proceso apoptótico. Estimulamos cultivos de células HeLa con anti-Fas/CD95 (50 ng/ml) y ciclohexamida (2.5 μ M) durante 0 y 4 horas. Posteriormente realizamos una inmunocitoquímica con los anticuerpos frente a FAF1, XIAP y β -tubulina como control. Las imágenes en la fila superior, muestran la colocalización control entre FAF1 y β -tubulina endógenos. La fila inferior muestra el marcaje de XIAP y FAF1 endógeno.

Utilizando las imágenes obtenidas, realizamos un estudio de colocalización cuantitativa de las proteínas FAF1 y XIAP o β -tubulina como proteína ubicua control (figura R22 y tabla R5). Las imágenes muestran que ambas proteínas siguen colocalizando en el citoplasma celular principalmente tras un estímulo apoptótico, y los valores obtenidos de colocalización para XIAP-FAF1 (Pr: $0,5331 \pm 0,123$, n=11; R:

0,647 ± 0,066, n=11) son superiores a los obtenidos en las imágenes control de FAF1 y β-tubulina (Pr: 0,276 ± 0,059, n=6; R: 0,421 ± 0,119, n=6). Los índices M1/M2 y k1/k2 también muestran valores superiores en el caso de las imágenes de XIAP-FAF1. El coeficiente de correlación de Pearson (Pr) y el coeficiente de solapamiento de Manders (R), no son significativamente diferentes entre las células no estimuladas (Figura R10 y tabla R3) y las células estimuladas 4 horas, por lo que la colocalización de XIAP y FAF1 no se ve alterada durante el proceso apoptótico.

COEFICIENTE		Colocalización FAF1-XIAP	Colocalización FAF1-β-tubulina
Coeficiente de correlación de Pearson (Pr)	$R_p = \frac{\sum (R_i - \bar{R}) \times (V_i - \bar{V})}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R})^2 \times \sum (V_i - \bar{V})^2}}$	0,533 ± 0,123	0,276 ± 0,066
Coeficiente de solapamiento de Manders (R)	$R = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sqrt{\sum (R_i)^2 \times \sum (V_i)^2}}$	0,647 ± 0,066	0,421 ± 0,142
Coeficientes de colocalización M1 (FAF1)	$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i}$	0,956 ± 0,014	0,842 ± 0,219
Coeficientes de colocalización M2 (XIAP/GFP)	$M_2 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum V_i}$	0,947 ± 0,026	0,805 ± 0,091
Coeficiente de solapamiento k1 (FAF1/GFP)	$k_1 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (R_i)^2}$	0,576 ± 0,135	0,527 ± 0,127
Coeficiente de solapamiento k2 (XIAP)	$k_2 = \frac{\sum (R_i \times V_i)}{\sum (V_i)^2}$	0,742 ± 0,097	0,417 ± 0,115

Tabla R5. Análisis de la colocalización de las proteínas FAF1 y XIAP endógenas en células HeLa durante el proceso apoptótico. Estimulamos cultivos de células HeLa con anti-Fas/CD95 (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μM) y realizamos una inmunocitoquímica (materiales y métodos, apartado 5.11) con anticuerpos específicos contra las proteínas XIAP, FAF1 y β-tubulina como control. Calculamos los valores de los coeficientes de colocalización indicados a partir de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas. Cada valor es la media de los valores obtenidos en 10 células diferentes en 2 experimentos independientes. El error expresado es la desviación estandar de los valores obtenidos. Los valores de todos los coeficientes para las proteínas XIAP-FAF1 son superiores que los obtenidos para la proteína FAF1 con la proteína control β-tubulina.

En los experimentos anteriores de colocalización en los que sobreexpresábamos XIAP y FAF1 (figura R9), obtuvimos una tendencia de FAF1 a acumularse en la membrana plasmática. Quisimos estudiar si este patrón se mantiene durante el proceso

apoptótico, y si la sobreexpresión de la proteína XIAP modifica esta tendencia, a causa de que la proteína XIAP interfiere en las funciones pro-apoptóticas de FAF1. Para ello realizamos un ensayo de inmunocitoquímica, en el que sobreexpresamos las proteínas XIAP y FAF1 o GFP y FAF1 como control en células humanas HeLa, y tras 24 horas, estimulamos los cultivos con el agonista anti-CD95/Fas durante diferentes tiempos (2 y 4 horas). Las imágenes (figura R23) muestran una localización de FAF1 en el citoplasma cuando es sobreexpresado junto con la proteína control GFP sin diferencias visibles según transcurre el proceso apoptótico.

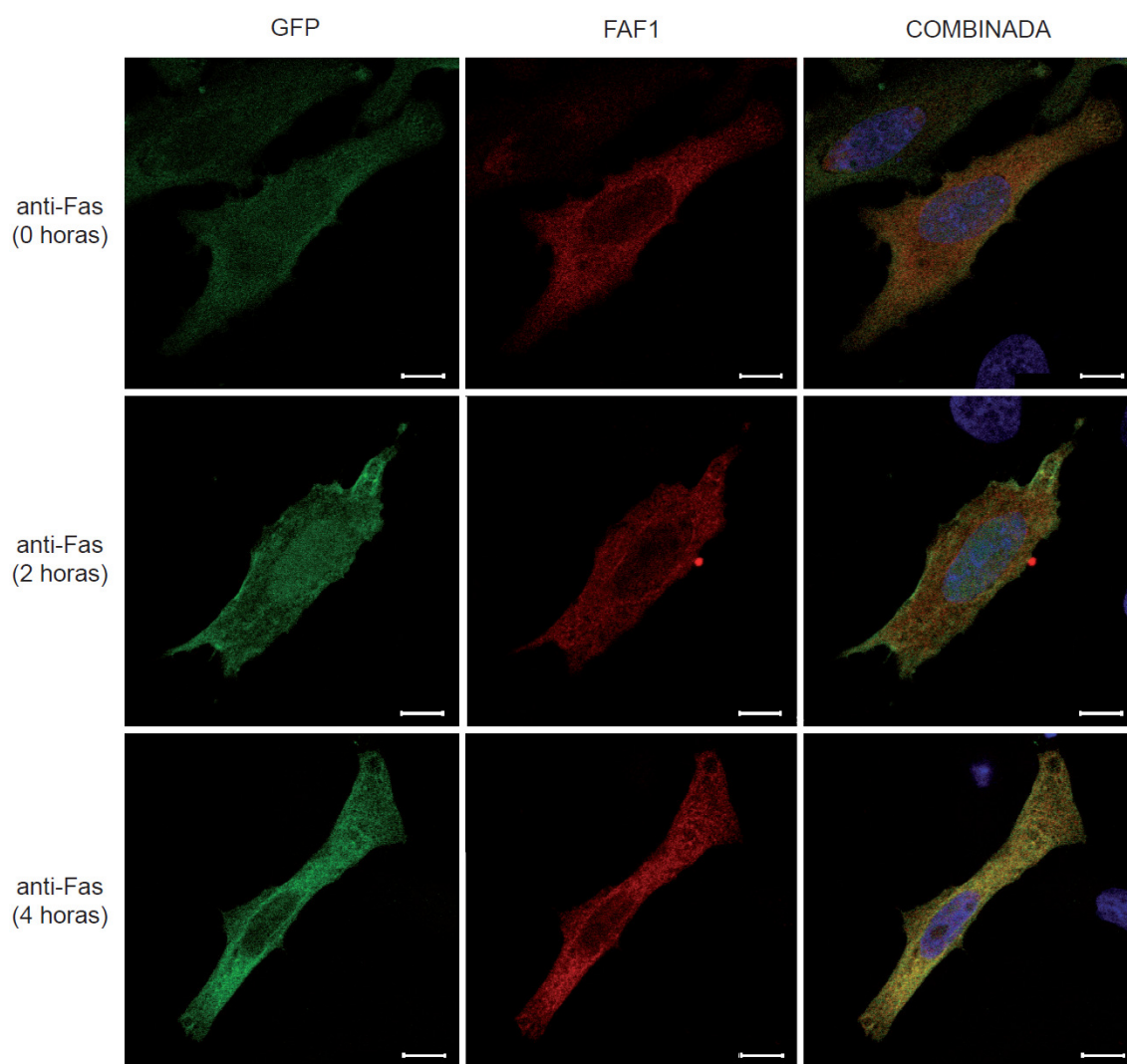


Figura R23. Localización de la proteína FAF1 durante el proceso apoptótico. Transfectamos cultivos de células Hela con los vectores de expresión que contenían los genes que codifican para las proteínas FAF1 ó EGFP como control durante 24 horas. Tratamos los cultivos con anti-Fas/CD95 (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μ M) durante 0, 2 y 4 horas. Posteriormente realizamos el protocolo de inmunocitoquímica según se describe en el apartado 5.11 de materiales y métodos. Las imágenes muestran baja colocalización entre las dos proteínas según los índices de colocalización analizados (Figura R26A).

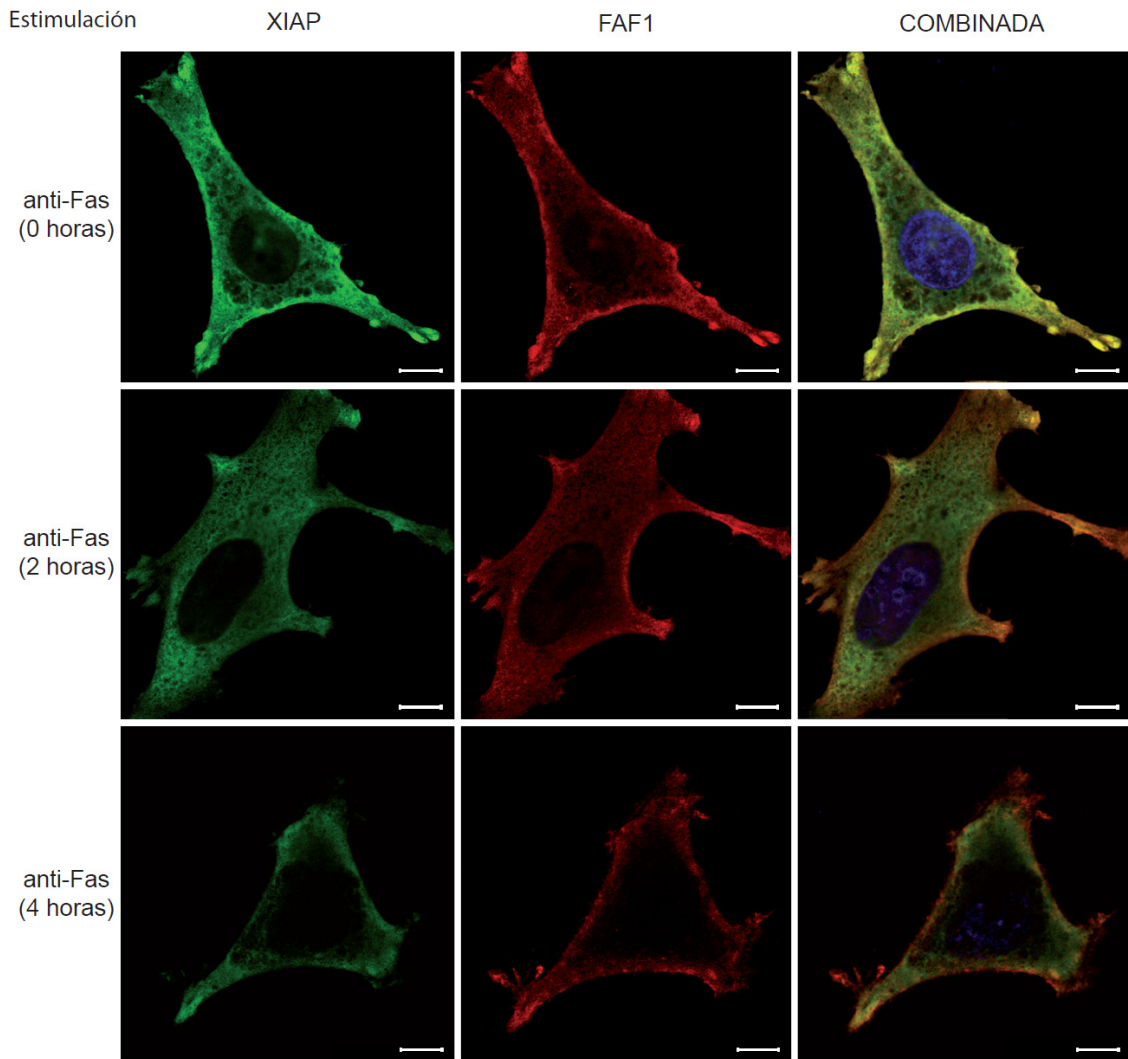


Figura R24. Colocalización de las proteínas FAF1 y XIAP durante el proceso apoptótico. Transfectamos células HeLa con la proteínas de fusión FAF1-HA ó GFP como control durante 24 horas. Tratamos los cultivos con anti-Fas (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μ M) durante 0, 2 y 4 horas. Posteriormente realizamos el protocolo de inmunocitoquímica según se describe en el apartado 5.11 de materiales y métodos. Las imágenes muestran una tendencia de la proteína FAF1 a localizarse en las proximidades de la membrana plasmática.

Cuando estudiamos las proteínas FAF1 y XIAP forzando su expresión durante el proceso apoptótico. La proteína XIAP presentó una distribución uniforme en el transcurso del proceso apoptótico, estando presente principalmente en el citoplasma y en el núcleo con menor intensidad. Por el contrario FAF1, presenta un marcaje menos homogéneo, apreciándose una tendencia a la acumulación en la membrana plasmática o desaparición en el citoplasma. Para visualizar esta desviación de la intensidad de fluorescencia de FAF1 en las imágenes realizamos una representación gráfica de las intensidades de un corte longitudinal de la célula. (Figura R25). En las gráficas vemos un incremento de intensidad de inmunomarcaje de FAF1 en la membrana plasmática. Este aumento de intensidad es mayor según se avanza en el proceso apoptótico.

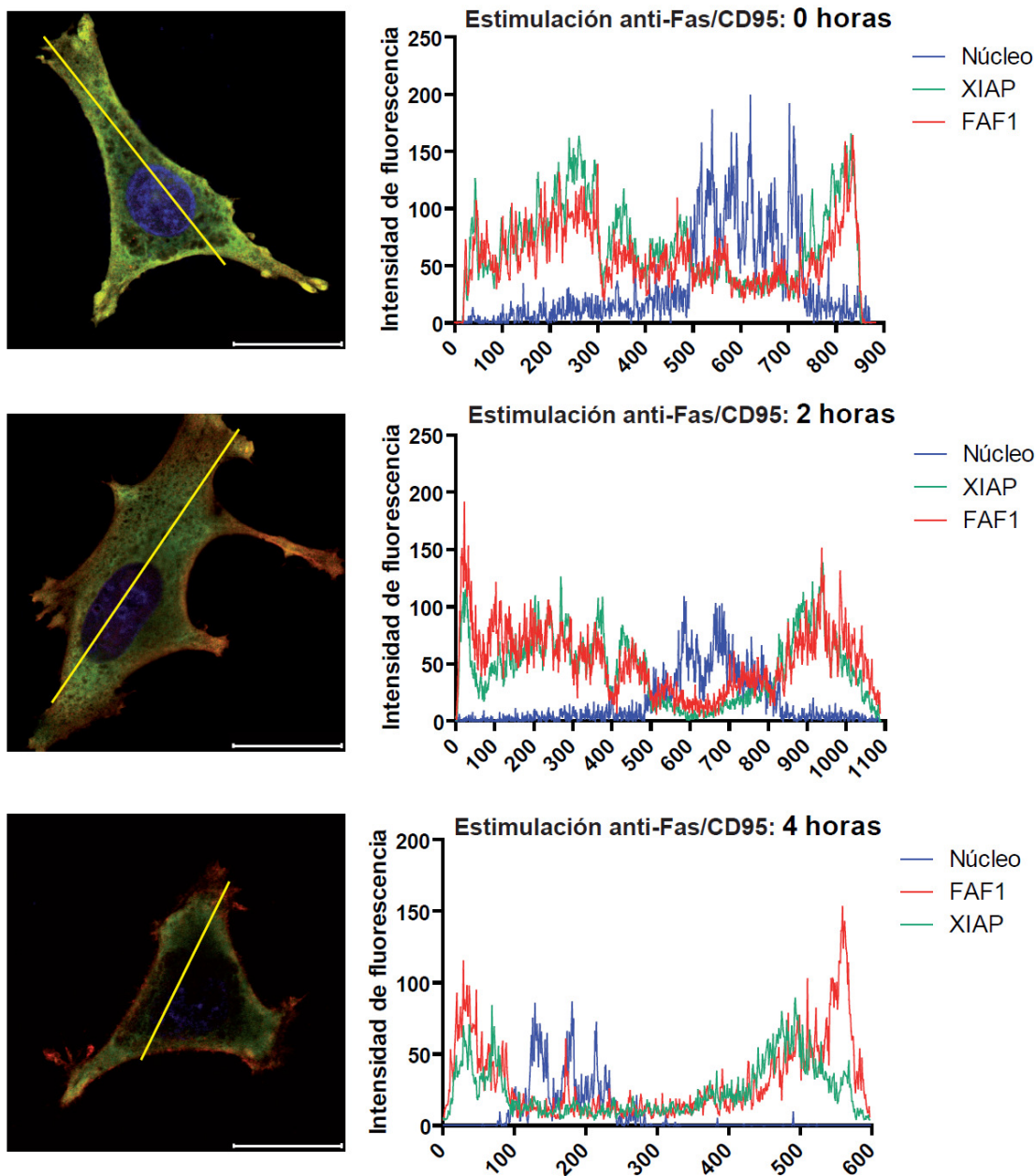


Figura R25. Histograma de una sección lineal representativo de células HeLa en proceso apoptótico. Analizamos la representación de intensidades de una sección longitudinal de células HeLa representativas que sobreexpresaban temporalmente XIAP y FAF1, a diferentes tiempos de estimulación apoptótica con anti-Fas/CD95 (50 ng/ml) y ciclohexamida (2,5 μ M) durante 18 horas. La barra inferior indica la escala de 25 μ m. Los gráficos muestran las intensidades del corte axial de la célula (línea amarilla) en el que la línea azul indica el valor de intensidad de fluorescencia por píxel para el marcador nuclear DAPI. La línea verde indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína c-myc-XIAP y la línea roja indica la intensidad de fluorescencia para el inmunomarcaje de la proteína HA-FAF1. Los histogramas muestran que la intensidad de FAF1 en la membrana es mayor según aumenta el tiempo de exposición al insulto.

Para estudiar las imágenes obtenidas, realizamos un análisis de colocación cuantitativa (materiales y métodos, apartado 5.11) (Figura R26). Los coeficientes calculados indican una alta colocación durante el proceso apoptótico, de las proteínas FAF1 y XIAP sobreexpresadas (Pr a 2 horas: $0,938 \pm 0,044$, $n=33$. Pr a 4

horas: $0,864 \pm 0,145$, $n=33$. R a 2 horas: $0,944 \pm 0,039$, $n=33$. R a 4 horas: $0,896 \pm 0,108$) igual que los resultados obtenidos en proteínas endógenas. Para estudiar la variación de intensidad de fluorescencia que aporta cada proteína a la imagen combinada calculamos los coeficientes de colocalización M1/M2 y los de solapamiento k1/k2. Estos últimos presentan un distanciamiento de sus valores en las fases de apoptosis (Figura R26B). Los valores de k1 y k2 antes de la estimulación son similares, pero a 2 y 4 horas de estímulo los valores de k2(XIAP) aumentan progresivamente, mientras que los de k1(FAF1) disminuyen.

En este apartado concluimos que durante el proceso apoptótico las proteínas FAF1 y XIAP mantienen unos altos valores de colocalización. Cuando las proteínas FAF1 y XIAP son sobreexpresadas, FAF1 tiene mayor presencia en la membrana celular que en el citoplasma en presencia de XIAP, aumentando esta acumulación según avanza la muerte celular.

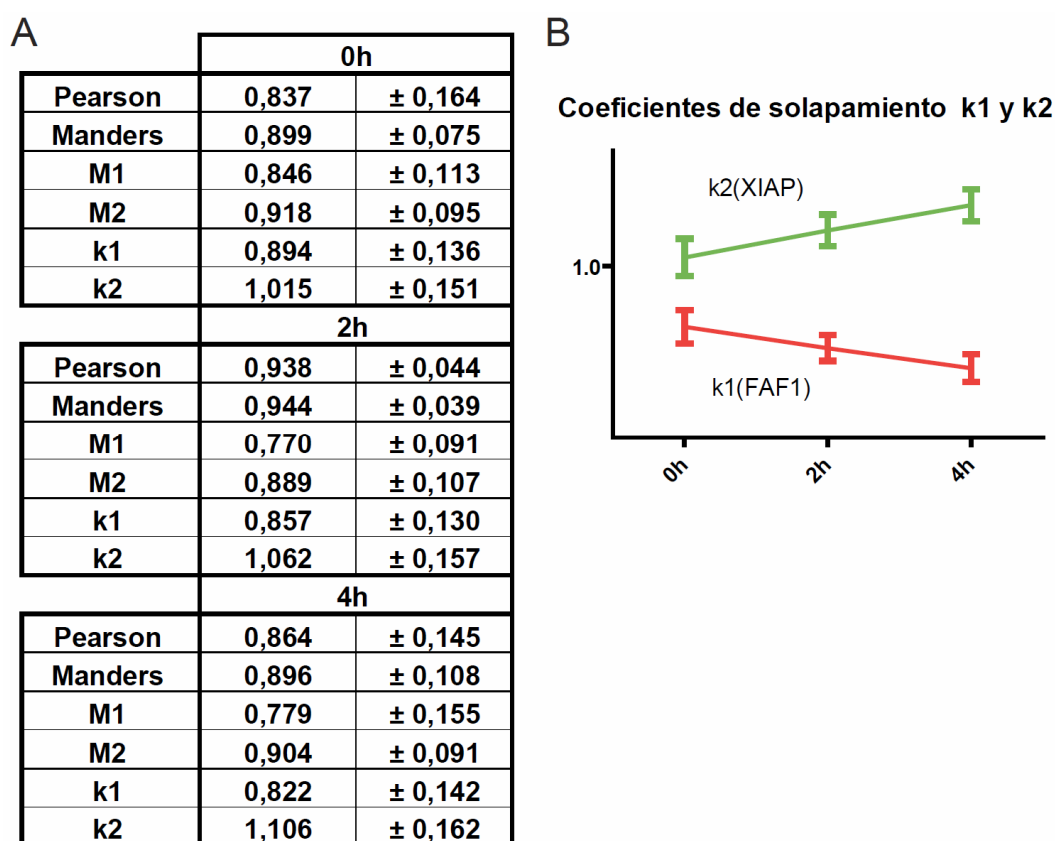


Figura R26. Análisis de de colocalización de las proteínas XIAP y FAF1 durante muerte celular. A. Partiendo de las imágenes de inmunofluorescencia de células HeLa estimuladas sin o con anti-Fas/CD95 durante 2h y 4h (figura R25), calculamos los valores de los coeficientes de colocalización indicados. Cada valor es la media de los valores obtenidos en 20 células diferentes en 3 experimentos independientes. El error expresado es la desviación estándar de los valores obtenidos. **B.** La gráfica muestra los valores de los coeficientes de solapamiento k1 y k2 para las intensidades de FAF1 y XIAP respectivamente. El error muestra la desviación estándar.

6.6 Modulación de la vía NF- κ B por la interacción XIAP-FAF1

Además de las funciones descritas para las proteínas FAF1 y XIAP en apoptosis, estas tienen también un importante papel en la modulación de la vía NF- κ B. Por un lado, FAF1 bloquea esta vía a diferentes niveles, desestabilizando el ensamblaje del complejo IKK, o uniéndose y secuestrando a la subunidad p65 de NF- κ B, evitando su entrada al núcleo. Por otro lado, XIAP induce la vía de NF- κ B al activar el complejo IKK, mediante la formación de un complejo ternario con TAB1 y TAK1 (Introducción, apartados 3.4 y 3.5).

Para estudiar como afecta la interacción de ambas proteínas en esta vía, inicialmente analizamos la acción de XIAP y FAF1 sobre la vía NF- κ B en distintas líneas celulares, empleando un ensayo dependiente de la expresión de un gen reportero luminiscente, en el que obtenemos una cuantificación relativa de la expresión génica debida al factor nuclear κ B. Estudiamos las líneas celulares: Neuroblastoma de ratón (N2A), neuroblastoma humano (SH-SY5Y), glioblastoma cerebral humano (T98G), glioma-astrocitoma humano (U373) y en células embrionarias humanas de riñón (HEK293T). En estas líneas celulares indujimos la sobreexpresión de XIAP, FAF1 o ambas proteínas (figura R27). Obtuvimos que la línea celular HEK293T mostraba mayor respuesta a la presencia de XIAP sobre la activación de NF- κ B. La sobreexpresión de FAF1 provocó un ligero descenso en la activación basal de NF- κ B. Seleccionamos las células HEK293T para los análisis posteriores, debido a su sensibilidad a la sobreexpresión de XIAP para la activación de la vía NF- κ B.

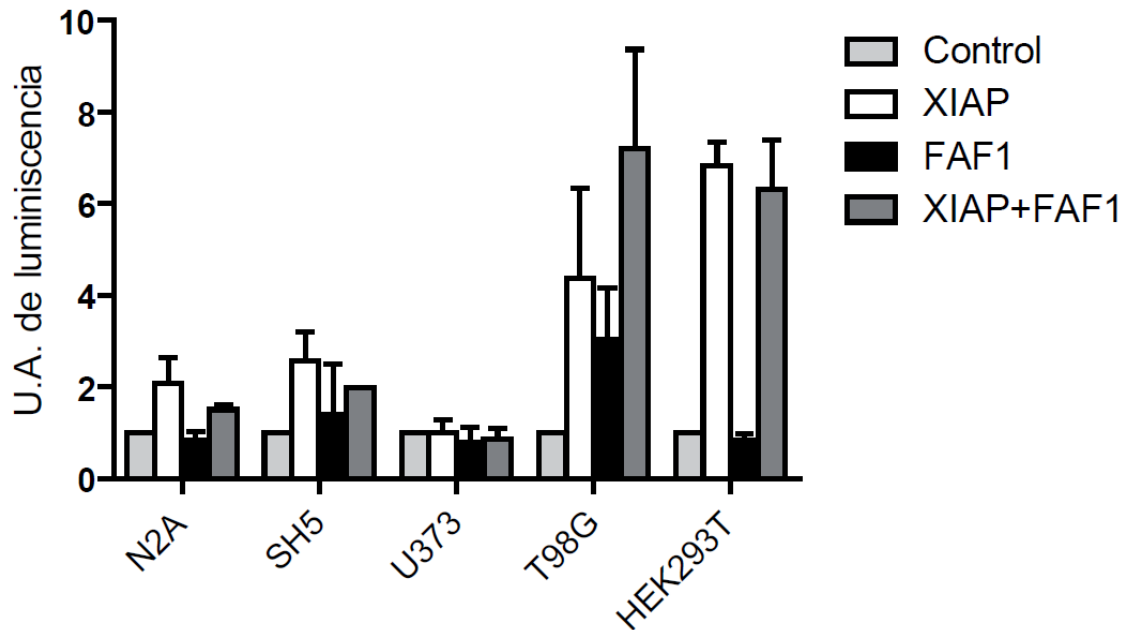


Figura R27: Respuesta de diferentes líneas celulares a la sobreexpresión de las proteínas XIAP y FAF1 sobre la actividad del factor nuclear κ B. Transfectamos cultivos de las líneas celulares: neuroblastoma murino N2a, neuroblastoma humano SH-SY5Y, astrocitoma humano U373, glioblastoma humano T98G y células embrionarias de riñón humano HEK293T, con los vectores plasmídicos que expresan las proteínas XIAP, FAF1 o se cotransfectaron con ambos durante 24 horas. Analizamos la actividad del factor nuclear κ B (NF- κ B) mediante un kit comercial de Luciferasa (Materiales y métodos, apartado 5.9). La actividad de NF- κ B se representa por unidades relativas de luminiscencia normalizadas frente a los valores control de cada tipo celular. Las barras de error muestran la desviación estandar (SD).

Para determinar la respuesta de esta línea celular frente a un estímulo inductor de la vía NF- κ B, sobreexpresamos transitoriamente las proteínas XIAP, FAF1 o ambas en cultivos de células HEK293T, los cuales estimulamos con el ligando del receptor TNFR1, TNF α (20 ng/ml) durante 6 horas. Las células mostraron unos valores de inducción de NF- κ B 500 veces mayores que las células sin estimulación independientemente de las proteínas sobreexpresadas. (Figura R28)

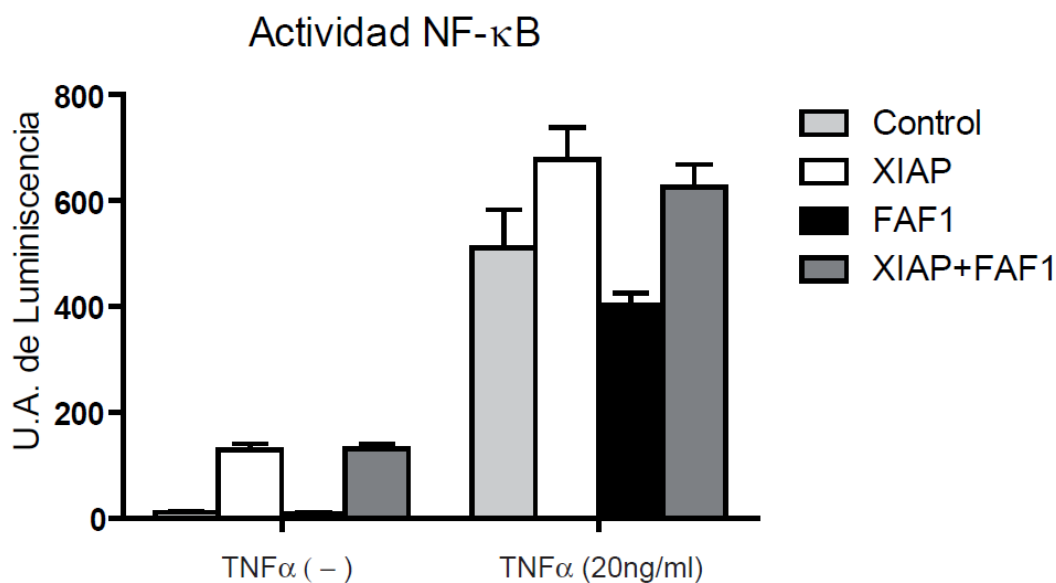


Figura R28. Actividad del factor nuclear κ B en células HEK 293T estimuladas con la citoquina TNF α . Sobreexpresamos las proteínas XIAP, FAF1 o ambas proteínas en cultivos de células HEK293T. Incubamos los cultivos con TNF α (20^{ng}/ml) durante 6 horas y analizamos la actividad de NF- κ B mediante un kit comercial de Luciferasa (Materiales y métodos, apartado 5.11). La actividad de NF- κ B se representa por unidades arbitrarias de luminiscencia normalizados con los valores de luciferasa de *Renilla*. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media (SD).

En cultivos celulares estimulados con TNF α (figura R28) que sobreexpresaban XIAP observamos un incremento de la actividad de NF- κ B (677,47 UAL) comparada con el control (510,21 UAL) y una disminución de la actividad NF- κ B en células que sobreexpresaban FAF1(403,09 UAL). Igualmente, la sobreexpresión de FAF1 redujo ligeramente el efecto de activación que XIAP provoca en esta vía (624,68 UAL).

Para determinar si FAF1 interfiere en el efecto promotor de XIAP sobre la activación de NF- κ B realizamos otro análisis de iguales características, con concentraciones crecientes de la proteína FAF1 cotransfectadas con la proteína XIAP. El análisis estadístico de los datos de este experimento mediante un modelo general lineal indicó que la activación de NF- κ B depende significativamente de la transfección con XIAP ($F_{1,4}=65.518$, $p<0,01$), del nivel de transfección de FAF1 ($F_{1,4}=27,538$; $p<0,01$) y de la estimulación con TNF α ($F_{1,4}=9,264$; $p<0,05$). Como se aprecia en la figura 29A, al aumentar la cantidad de la proteína FAF1, el efecto de la proteína XIAP disminuye de manera dosis-dependiente. Seleccionamos la relación 1:3 como la relación de concentración XIAP:FAF1 mas adecuada para los siguientes estudios, ya que FAF1, en estas condiciones, es capaz de revertir parcialmente los efectos de XIAP sobre la

expresión de NF- κ B (figura R29A). Este resultado se obtuvo tanto en células no estimuladas como en células estimuladas con TNF α (20 ng/ml). Estos resultados muestran que la proteína FAF1 no es capaz de inhibir completamente la inducción de NF- κ B debido a XIAP, pero sí es capaz de atenuar su acción de manera dosis-dependiente (figura R29A).

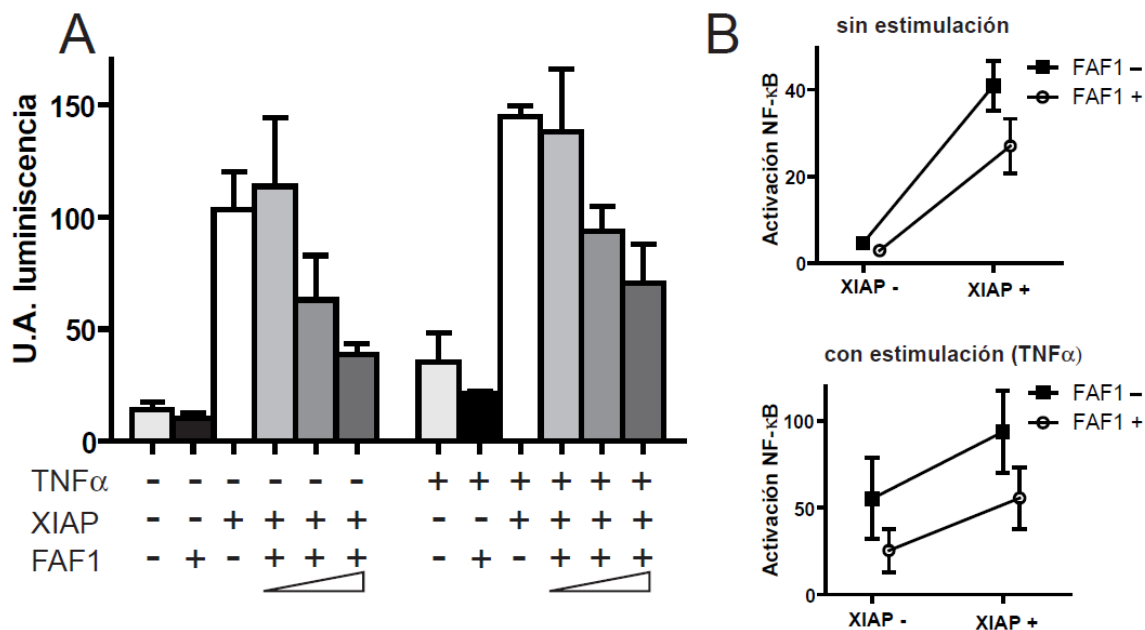


Figura R29. Efecto de las proteínas FAF1 y XIAP en la activación de la vía NF- κ B. A. Efecto de la concentración de FAF1 en la activación de NF- κ B. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para las proteínas XIAP, FAF1 o cotransfectamos ambos en los ratios 1:1, 1:2 y 1:3 durante 24 horas. Incubamos los cultivos con o sin TNF α (20 ng/ml) durante 6 horas y medimos la actividad NF- κ B con un kit comercial (Materiales y métodos, apartado 5.9). El gráfico muestra Unidades Relativas de Luminiscencia de los cultivos estudiados (n=9) \pm el error estándar de la media (SEM). B. Estudio estadístico del efecto de las proteínas XIAP y FAF1 en la vía NF- κ B. Utilizamos Realizamos un ANOVA de 2 vías de la acción de las proteínas XIAP y FAF1 sobre la activación de NF- κ B, utilizando los valores de la sobreexpresión de XIAP, FAF1 y la coexpresión de XIAP y FAF1 en la relación 1:3. Se empleó un diseño de medidas repetidas (apareado) para eliminar el efecto de las diferencias en las medidas asociadas a cada experimento individual. Las gráficas muestran la activación de NF- κ B medido mediante UAL (n=9) \pm el error estándar de la media (SEM).

Para confirmar la capacidad de la transfección de FAF1 a altas concentraciones (3:1 respecto a XIAP) para bloquear la activación de la NF- κ B inducida por la sobreexpresión de XIAP se incorporaron nuevos experimentos. El análisis de los resultados de estos experimentos mediante ANOVA de 2 vías (con el experimento como factor aleatorio o bloque) separados para células sin y con estimulación con TNF α confirmó que el efecto de FAF1 no es pronunciado aunque significativo

($F_{1,6}=8,718$; $p=0,0255$) mientras que XIAP causa un aumento muy significativo ($F_{1,6}=35,43$; $p<0,01$) de la actividad de NF- κ B. El análisis también mostró que el término de interacción (estadística) entre ambos factores (+/-XIAP y +/-FAF1) es significativo ($F_{1,6}=6,313$; $p=0,047$), de forma que el efecto de la transfección de ambas proteínas depende de la transfección o no de la otra como se aprecia claramente en la figura 30B. Por tanto, en conjunto los resultados de análisis revelan que el efecto de la transfección de cualquiera de las dos proteínas depende del estado de la otra, de forma que FAF1 no reduce la activación de NF- κ B en condiciones control pero si la reduce cuando XIAP está presente. Esto podría indicar que FAF1 está regulando de alguna manera la actividad de XIAP sobre esta vía o que el efecto inhibitor de FAF1 no se aprecia en ausencia de XIAP por falta de activación de la vía. Para confirmar esta última posibilidad se añadieron nuevos experimentos con células estimuladas con TNF α . Los ANOVA de 2 vías de estos datos indican que tanto la acción de la proteína XIAP como de la proteína FAF1 sobre la activación de NF- κ B es muy significativa ($F_{1,6}=37,56$; $p<0,001$ y $F_{1,6}=15,12$; $p<0,01$, respectivamente). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en el análisis de las células sin estimular, el término interacción no resultó significativo ($F_{1,6}=0,892$; $p=0,381$), es decir, la acción de cada proteína en la activación de la vía NF- κ B no afecta significativamente a la acción de la otra proteína. Como consecuencia, la sobreexpresión de ambas proteínas resultó en unos valores de Intensidad de luciferasa intermedios entre los valores obtenidos al sobreexpresar únicamente la proteína FAF1 o XIAP. Por tanto, este resultado indica que la activación de la vía resulta en la suma de los efectos individuales de ambas proteínas.

6.6.1. Modulación de FAF1 sobre la actividad de XIAP en la vía NF- κ B

Para determinar el papel de FAF1 sobre la activación de NF- κ B debida a XIAP sobreexpresamos XIAP, FAF1 y el mutante de FAF1 que interacciona con XIAP, FAF1- Δ CtDEDID, en cultivos celulares HEK293T según mostramos en la figura R30. El mutante de FAF1, FAF1- Δ CtDEDID, que mantiene la capacidad de unirse a IKK β , atenúa ligeramente ($0,818 \pm 0,067$ normalizado frente al control) la actividad basal de NF- κ B, peor no a los niveles de reducción de actividad alcanzados por la proteína nativa FAF1 ($0,563 \pm 0,049$), además cuando este mutante es coexpresado con XIAP no

reduce la activación de NF- κ B ($10,015 \pm 2,562$), siendo similar al alcanzado por los cultivos que sobreexpresaban solo XIAP ($9,163 \pm 0,938$). Por otro lado, el mutante de XIAP- Δ RING, sin capacidad enzimática de ubiquitinación tiene unos niveles ($0,896 \pm 0,018$) similares al control, no siendo capaz de activar la vía de NF- κ B, sin el dominio RING.

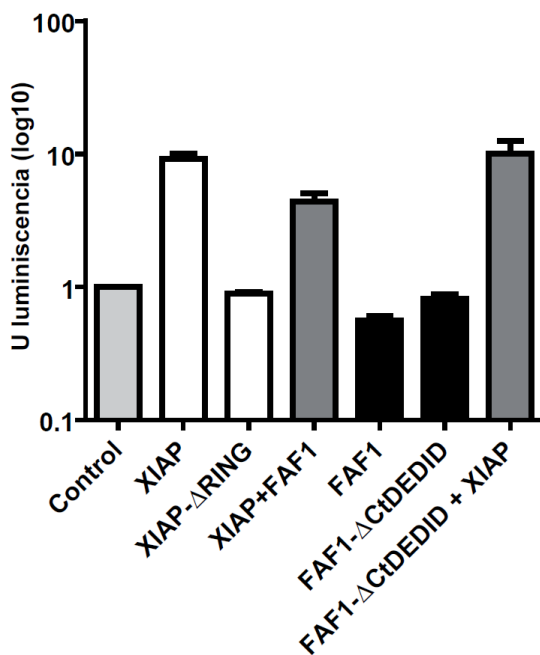


Figura R30. Efecto de la proteína FAF1 en la vía de señalización de NF- κ B activada por XIAP. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para las proteínas XIAP, FAF1 y/o alguno de sus mutantes, así como los plásmidos para el estudio de actividad NF- κ B, Luciferasa y Renilla. Tras 36 horas determinamos la actividad NF- κ B mediante un kit comercial de genes reporteros de Luciferasa (materiales y métodos, apartado 5.9). La actividad de NF- κ B se muestra en log₁₀ de Unidades Relativas de Luminiscencia normalizadas frente a los valores de los cultivos control. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM) (n=7).

Para extender estas observaciones y estudiar el efecto de inhibición de FAF1 sobre la vía NF- κ B, realizamos el mismo experimento en células estimuladas con TNF α . En este estudio, el mutante FAF1- Δ CtDEDID bloqueó significativamente la activación de la vía NF- κ B ($0,683 \pm 0,122$ normalizado frente al control), aunque a unos niveles menores que la inhibición que ejerció la proteína FAF1 nativa ($0,43 \pm 0,058$). En cultivos celulares en los que coexpresamos XIAP con FAF1 o su mutante FAF1- Δ CtDEDID, la activación de NF- κ B de los cultivos que sobreexpresaban XIAP ($3,37 \pm 0,667$ veces respecto al control) se vio inhibida significativamente ($1,78 \pm 0,3$; $p=0,0014$, $T_7=4,52$) por la coexpresión con FAF1, pero también por la coexpresión con el mutante FAF1- Δ CtDEDID ($1,28 \pm 0,3$; $p=0,038$, $T_4=2,665$).

Estos datos sugieren que la pérdida del dominio de unión a p65 disminuye parcialmente la acción inhibitoria de la proteína FAF1 sobre la vía NF- κ B.

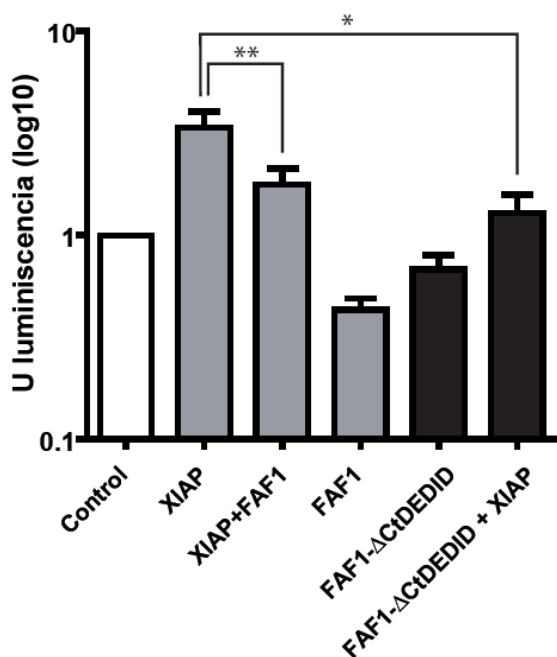


Figura R31. Efecto del mutante FAF1-ΔCtDEDID en la vía de señalización de NF-κB activada por TNFα y XIAP. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para las proteínas XIAP, FAF1 y su mutante de delección FAF1-ΔCtDEDID, así como los plásmidos para el estudio de actividad NF-κB, Luciferasa y Renilla. Tras 36 horas, tratamos los cultivos con TNFα (20 ng/ml) durante 6 horas y determinamos la actividad de NF-κB mediante un kit comercial de genes reporteros Luciferasa (materiales y métodos, apartado 5.11). La actividad de NF-κB se muestra en log₁₀ de Unidades Relativas de Luminiscencia normalizadas frente a los valores de los cultivos control. El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student de 1 cola, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $n=4-9$. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

Atendiendo a estos resultados, estudiamos si FAF1 ejerce esta atenuación, bloqueando la vía de NF-κB en la formación del complejo de IKKs y secuestro de p65/RelA o también de forma indirecta por interferencia sobre el complejo ternario formado por XIAP-TAB1-TAK1. Para ello sobreexpresamos la proteína XIAP junto con concentraciones crecientes de la proteína FAF1 en la línea celular HEK-293T. Estimulamos los cultivos con TNFα (20 ng/ml) y realizamos una inmunoprecipitación contra XIAP, resolviendo los inmunocomplejos mediante *western-blot* con el anticuerpo contra la proteína TAB1 (figura R32B). El panel superior muestra que concentraciones crecientes de FAF1 no afectan a la interacción XIAP-TAB1.

De este modo, la atenuación debida a FAF1 que observamos en la respuesta de NF-κB inducida por XIAP es debido a la desestabilización del complejo IKK y secuestro de p65/RelA y no a la disrupción del complejo ternario XIAP-TAB1-TAK1 (figura R32A).

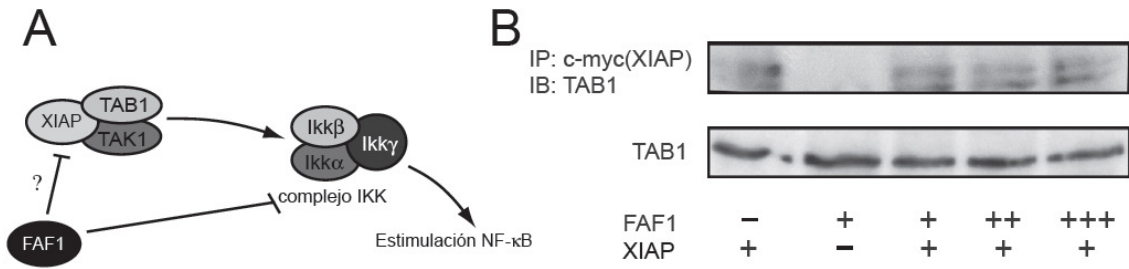


Figura R32. Interferencia de la proteína FAF1 en la formación del complejo XIAP-TAB1-TAK1.

A. Esquema de la interacción de la proteína XIAP con la activación de la vía NF- κ B mediante el complejo TAB1-TAK1. B. Inmunoprecipitación y detección de la proteína Tab1 en presencia de concentraciones crecientes de la proteína FAF1. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para las proteínas XIAP y FAF1, o una cotransfección de ambos en los ratios 1:1, 1:2 y 1:3 durante 24 horas. Incubamos las células con TNF α (20 ng/ml) durante 30 minutos y obtuvimos extractos para realizar una inmunoprecipitación con anticuerpos específicos (protocolo del apartado 5.7 de materiales y métodos). En el panel superior se muestran los niveles de la proteína TAB1 inmunoprecipitados junto a la proteína XIAP y en el panel inferior los niveles totales de la proteína TAB1 de cada cultivo. La membrana mostrada es representativa de un grupo de n=5.

6.6.2 Modulación de XIAP sobre la actividad de FAF1 en la vía de NF- κ B

De igual forma que en la sección anterior, para determinar el papel de XIAP en la inhibición de FAF1 empleamos cultivos celulares de HEK293T estimulados con el factor TNF α en los que sobreexpresamos las proteínas FAF1, XIAP y el mutante de delección XIAP- Δ RING, para determinar la activación de la vía NF- κ B. Este ensayo mostró (figura R33) que a diferencia de la proteína nativa XIAP, su mutante de delección XIAP- Δ RING no era capaz de elevar los niveles de expresión de NF- κ B a niveles por encima del control (1,118 \pm 0,1775), reflejando que el dominio RING es indispensable para la activación de la vía NF- κ B.

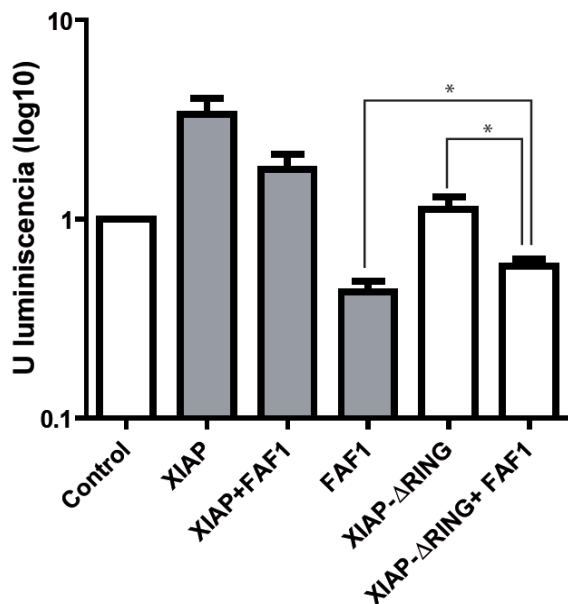


Figura R33. Efecto de la proteína mutante XIAP- Δ RING en la inhibición de la actividad NF- κ B debida a la proteína FAF1. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los vectores de expresión para las proteínas XIAP, FAF1 y su mutante de delección FAF1- Δ CtDEDID, así como los plásmidos para el estudio de actividad NF- κ B, Luciferasa y Renilla. Tras 36 horas, tratamos los cultivos con TNF α (20 ng/ml) durante 6 horas y determinamos la actividad de NF- κ B mediante un kit comercial de genes reporteros Luciferasa (materiales y métodos, apartado 5.11). La actividad de NF- κ B se muestra en log₁₀ de Unidades Relativas de Luminiscencia normalizadas frente a los valores de los cultivos control. El análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student de 1 cola, $p^* < 0,05$, $n=9$. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

Por otra parte, cuando el mutante XIAP- Δ RING se cotransfectó con FAF1, la actividad de NF- κ B fue recuperada parcialmente. Este resultado sugiere, que el dominio RING de XIAP no es imprescindible para atenuar el bloqueo de la vía NF- κ B debida a FAF1. Nuestros estudios de interacción han mostrado que XIAP se une a través de sus dominios BIR a FAF1 en la región DEDID, la cual se interacciona y secuestra al factor de transcripción p65/RelA en el citoplasma. De este modo, XIAP podría bloquear el efecto de FAF1 en la vía NF- κ B, inhibiendo su unión a p65/RelA. Para el estudio de esta posible interferencia realizamos en primer lugar una inmunoprecipitación de FAF1 y p65/RelA en presencia de concentraciones crecientes de XIAP (figura R34B). Los resultados muestran que la cantidad de p65/RelA inmunoprecipitado con FAF1 disminuía acorde con el aumento de XIAP transfectada, lo que indica una obstrucción de la unión FAF1-p65 por parte de la proteína XIAP.

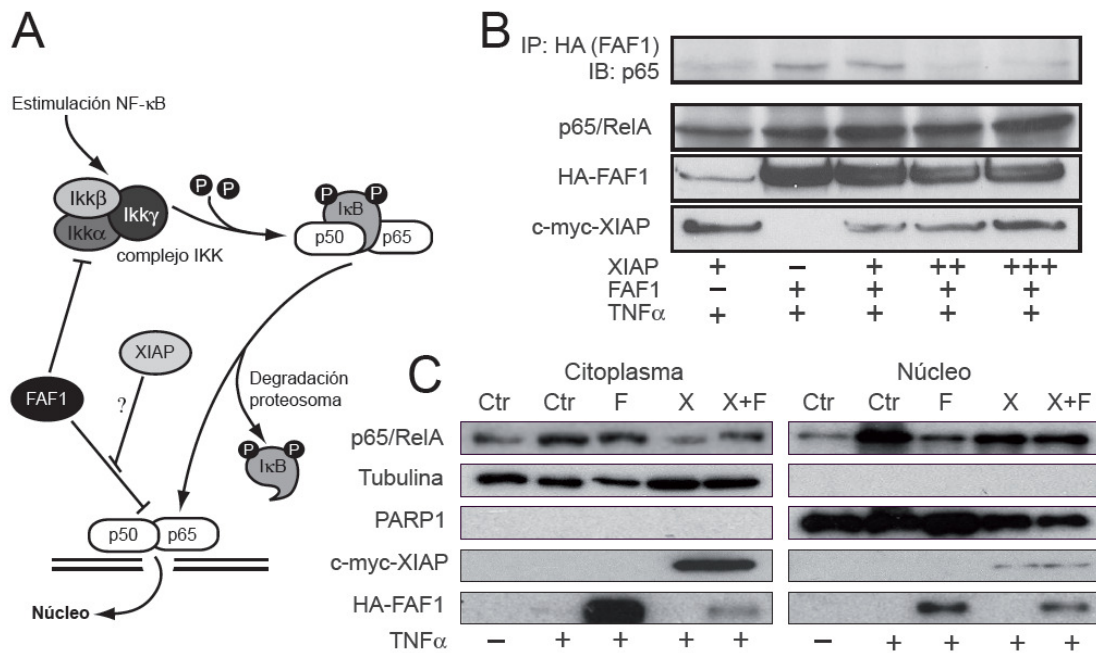


Figura R34. Interferencia de la proteína XIAP en el secuestro del factor p65 en el citoplasma por la proteína FAF1. **A.** Esquema de la activación de NF- κ B (p50-p65/RelA) y punto de interacción estudiado entre las proteínas XIAP y FAF1. **B.** Inmunoprecipitación de la proteína FAF1 y el factor nuclear p65, en presencia de concentraciones crecientes de la proteína XIAP. Transfectamos cultivos de células HEK293T con los plásmidos de FAF1, XIAP o ambos en los ratios 1:1, 1:2 y 1:3 durante 36 horas. Incubamos los cultivos con TNF α (20 ng/ml) durante 30 minutos. Obtuvimos extractos celulares con los que realizamos el análisis de inmunoprecipitación (materiales y métodos, apartado 5.7). El panel inferior muestra los niveles totales del factor p65, FAF1 y XIAP en los extractos. **C.** Análisis del factor nuclear p65 en extractos de citoplasma y núcleo. Transfectamos células HEK293T con los vectores de expresión para FAF1, XIAP o cotransfectados con ambos plásmidos durante 36 horas. Incubamos los cultivos con o sin TNF α (20 ng/ml) durante 30 minutos y obtuvimos extractos celulares de citoplasma y núcleo (materiales y métodos, apartado 5.5.1). Los paneles muestran los niveles del factor p65 en las diferentes condiciones de cultivo. Utilizamos las proteínas PARP y tubulina como controles de pureza de los extractos de núcleo y citoplasma.

Para determinar en detalle esta interferencia realizamos un segundo ensayo consistente en evaluar la presencia de p65 en el núcleo y en el citoplasma en presencia de XIAP (figura R34C). Transfectamos cultivos de células HEK293T con XIAP y/o FAF1 y los estimulamos con TNF α . Obtuvimos extractos de núcleo y citoplasma y detectamos la presencia del factor de transcripción p65 en cada una de las condiciones mediante *western-blot*. Este segundo ensayo mostró que la cantidad de proteína p65 detectada en el citoplasma de células que sobreexpresaron XIAP fue menor que en cultivos que sobreexpresaron FAF1. Al coexpresar tanto la proteína XIAP como la proteína FAF1 los niveles de p65 en el citoplasma disminuyeron a niveles por debajo de los basales (figura R34C). Por otra parte, los niveles de p65 en el núcleo fueron mayores en presencia de XIAP y en presencia de FAF1 resultaron menores que el control. Al cotransfectar ambas proteínas detectamos a la proteína p65 en el núcleo en mayores cantidades que cuando se sobreexpresó solo FAF1.

Estos ensayos indican que la proteína XIAP interfiere en la unión entre FAF1 y p65, no permitiendo su secuestro en el citoplasma, y permitiendo su entrada al núcleo. Además, los datos mostrados sugieren que la interacción de XIAP con FAF1 es suficiente para atenuar el bloqueo de FAF1 sobre la vía NF- κ B.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1. Validación de la interacción XIAP-FAF1

El punto de partida de esta tesis doctoral ha sido verificar la interacción de la proteína FAF1 con XIAP, para posteriormente caracterizar esta interacción y estudiar su implicación funcional en las vías de muerte y supervivencia celular. Tanto FAF1 como XIAP han sido ampliamente estudiadas por su implicación en una gran variedad de procesos, mayormente relacionados con el equilibrio entre supervivencia y muerte celular (Wei, Fan et al. 2008; Menges, Altomare et al. 2009; Galban and Duckett 2010). El conocimiento de la interacción entre estas proteínas, su acción sobre las cascadas de señalización y la regulación que unas ejercen sobre otras, nos ofrece un campo estratégico para determinar la muerte o supervivencia de una célula y corregir patrones incorrectos en cuadros patológicos. De esta manera, podemos potenciar la acción de unas proteínas o bloquear otras para favorecer la muerte, o evitarla según la ocasión.

Aunque algunas proteínas desarrollan sus funciones de forma aislada, la mayoría interaccionan con otras proteínas formando complejos y redes que orquestan los procesos de los que depende la estructura y función de la célula, incluyendo el control del ciclo celular, la diferenciación, la señalización o la muerte celular, por nombrar algunos. La interacción entre proteínas permite modificar las propiedades cinéticas de enzimas, inactivar o destruir proteínas, cambiar la especificidad de sustrato o crear nuevos sitios unión. Su pérdida puede derivar en patologías que sólo pueden ser entendidas y reparadas si se conoce la red de interacciones que regulan el proceso defectuoso. Por tanto, el estudio de las interacciones es fundamental para comprender el papel que cumplen las proteínas en la célula, hasta el punto de que la caracterización del conjunto de interacciones que ocurren en un contexto celular determinado (su “interactoma”) es considerado el siguiente hito a alcanzar en el camino hacia la comprensión de la bioquímica celular.

Desde el descubrimiento de XIAP, se ha descrito su interacción con numerosas proteínas relacionadas con la apoptosis, empezando por las caspasas (Holcik and Korneluk 2001) y continuando con antagonistas de IAPs capaces de bloquear su

interacción con las caspasas (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000; Hegde, Srinivasula et al. 2002; Verhagen, Kratina et al. 2006; Bornstein, Gottfried et al. 2011). En la búsqueda de nuevos interactores, estudios preliminares de nuestro grupo mediante análisis de dos híbridos en levaduras, empleando como proteína cebo un mutante truncado en la zona carboxilo terminal de XIAP, permitieron identificar a FAF1 como posible candidato. FAF1 es una proteína implicada en el proceso de muerte celular pero también en otros procesos celulares regulados por XIAP, por lo que *a priori* resulta un candidato excelente para estudiar su interacción con XIAP.

Nuestros estudios con XIAP y FAF1 humanas expresadas en cultivos de levadura en medios selectivos validaron la interacción observada en el ensayo de dos híbridos. Sin embargo, dado que el plegamiento de proteínas en organismos eucariota tan dispares como levadura y mamífero tienen diferencias en la complejidad y en las moléculas responsables de este proceso (Young, Agashe et al. 2004), así como en las modificaciones post-transcripcionales (Polevoda and Sherman 2003; Lehle, Strahl et al. 2006), empleamos sistemas basados en células humanas para validar la interacción en nuestra especie. Los posteriores ensayos *in vitro* de *pull down* GST permitieron confirmar la interacción de FAF1 proveniente de células humanas con XIAP sobreexpresado en bacterias. Para completar la validación, empleamos un ensayo de inmunoprecipitación de las proteínas FAF1 y XIAP sobreexpresadas y endógenas en la línea celular humana HeLa que demostraron de forma inequívoca la existencia de esta nueva interacción en nuestra especie. En conjunto, estos ensayos confirmaron los resultados del ensayo de dos híbridos, demostrando la interacción entre las proteínas FAF1 y XIAP.

Estos resultados contrastan con los publicados por Kinoshita y colaboradores en su estudio sobre la función de FAF1 en la regulación de la inflamación mediada por NF- κ B (Kinoshita, Kondoh et al. 2006). Estos autores incorporaron a XIAP para evaluar la especificidad de la interacción de FAF1 con proteínas de la familia PYPAF (PYRIN-containing apoptotic protease-activating factor 1-like proteins) en ensayos de inmunoprecipitación en células HEK293T, observando que FAF1 co-inmunoprecipitaba con PYPAF1 pero no con XIAP. Esta disparidad resulta difícil de interpretar. Es posible que estén asociadas a la diferencia en el tipo de células empleadas. Es decir, podría deberse a modificaciones específicas de estos tipos celulares que modularán la

interacción. Sin embargo, tanto FAF1 como XIAP muestran sus pesos característicos en nuestros ensayos y Kinoshita tampoco menciona ninguna alteración que justifique la falta de interacción. Alternativamente, la disparidad entre los resultados puede deberse al tipo de anticuerpo empleado en los ensayos de inmunoprecipitación. En su trabajo, Kinoshita y colaboradores emplearon un antisuero de ratones inmunizados para FAF1, con una menor sensibilidad en la detección frente a la utilización de anticuerpos monoclonales como los empleados en nuestro estudio (Shalit, McKee et al. 1985). En este sentido, los resultados de la presente tesis así como datos preliminares en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y no incluidos en la presente tesis y los ensayos de caracterización de las regiones de unión entre ambas proteínas en células de neuroblastoma murino Neuro-2a demuestran claramente la existencia de esta interacción en diferentes líneas celulares. La explicación precisa de las causas por las cuales Kinoshita y colaboradores no observaron esta interacción requeriría estudios adicionales, posiblemente analizando células de la línea HEK293T con anticuerpos monoclonales.

7.2. Distribución intracelular e interacción XIAP-FAF1

La validación de una interacción entre dos proteínas mediante técnicas moleculares que implican la lisis de las células no significa *per se* que la interacción tenga lugar en células intactas. Muchas interacciones potenciales no llegan a producirse porque las proteínas implicadas se distribuyen en compartimentos celulares distintos (Rao, Srinivas et al. 2014). En numerosas ocasiones esta segregación subcelular actúa como sistema de regulación del momento de la interacción, de forma que ésta sólo se produce ante determinados estímulos que causan el desplazamiento de las dos proteínas al mismo compartimento celular. De hecho, este es el mecanismo que controla la interacción de XIAP con sus inhibidores mitocondriales SMAC/DIABLO, Omi/HtrA2 y otras proteínas con dominio IBM (*IAPs Binding Motif*), que únicamente interaccionan con XIAP cuando se liberan al citoplasma tras la permeabilización de la membrana mitocondrial causada por la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Galban and Duckett 2010).

Nuestros análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de FAF1 y XIAP, tanto de forma endógena como sobreexpresadas, muestran que ambas

tienen una distribución similar, fundamentalmente citoplasmática, en las células HeLa. Adicionalmente, también observamos un intenso marcaje de FAF1 en el núcleo de algunas células. El predominio de XIAP en el citoplasma es general en diferentes tejidos humanos (Vischioni, van der Valk et al. 2006), aunque también se observa en el núcleo de algunos tipos celulares como las células del folículo del ovario (Phillipps and Hurst 2012) o en la región perinuclear de neuronas (Lotocki, Alonso et al. 2003). En células HeLa, los resultados obtenidos coinciden plenamente con las observaciones de Liston y colaboradores (Liston, Fong et al. 2001), aunque estos autores describen una mayor señal en la región perinuclear (sin alcanzar la segregación observada en neuronas por Lotocki y colaboradores (Lotocki, Alonso et al. 2003)), que nosotros no hemos observado. Esta diferencia podría deberse a diferencias en la proteína de fusión empleada ya que en los estudios de Liston, se usó GFP-XIAP mientras que en este trabajo se ha empleado c-myc-XIAP, o a diferencias en el microscopio utilizado, ya que el trabajo de Liston muestra imágenes de microscopía de fluorescencia donde se acumula la fluorescencia emitida por toda la célula, mientras que en este trabajo empleamos imágenes confocales que analizan la fluorescencia de un plano de aproximadamente 1 micra de grosor. Por su parte, la distribución de FAF1 en el citoplasma y el núcleo de células HeLa coincide con observaciones previas tanto en líneas celulares como en tejidos (Frohlich, Risau et al. 1998). También ha sido descrito el marcaje de FAF1 en la membrana citoplasmática de la línea celular Jurkat de linfocitos T, donde formaría parte de los complejos DISC (Ryu, Lee et al. 2003).

Como complemento al marcaje individual de ambas proteínas, también hemos analizado su colocalización dentro de la célula, tanto con niveles de expresión endógenos como tras su sobreexpresión. La colocalización de antígenos puede apoyar la existencia de características estructurales o funcionales comunes (Zinchuk, Zinchuk et al. 2007). En este sentido, los análisis cuantitativos basados en coeficientes de colocalización o solapamiento añaden una información interesante que no es accesible a través de los estudios cualitativos. En este sentido, los ensayos realizados con proteínas endógenas muestran una colocalización casi completa de ambas proteínas, con niveles próximos a 1 (100% de colocalización) en los índices de Pearson y Manders, significativamente superior a lo esperado por distribuciones al azar. El estudio adicional de la contribución de XIAP y FAF1 a la colocalización mediante los índices k_1 y k_2 mostró valores mayores para k_1 (FAF1) que para k_2 (XIAP), indicativo de una mayor

contribución de FAF1 en las áreas de colocalización (Zinchuk, Zinchuk et al. 2007). Es decir, FAF1 aparece más asociada a XIAP de lo que XIAP aparece asociada a FAF1. Dado el nivel de resolución de esta metodología, el solapamiento del marcaje de FAF1 y XIAP no puede considerarse como una evidencia de la interacción entre ambas proteínas, para lo que se requerirían técnicas específicas como el FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) o el FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*). Sin embargo, los análisis de inmunocitoquímica confirman que ambas proteínas están presentes simultáneamente en el citoplasma con una distribución que permite o incluso favorece su interacción en células intactas.

7.3. Regiones mínimas de interacción entre XIAP y FAF1

Como hemos mencionado anteriormente, el descubrimiento de una nueva interacción supone un potencial nuevo punto de regulación de las funciones de las proteínas implicadas. En el flujo hacia verificar y caracterizar dicha regulación, el estudio de las regiones de interacción entre ambas proteínas ofrece una aproximación a las funciones celulares que pueden verse alteradas por la interacción.

En la búsqueda de la región mínima de interacción en la proteína XIAP, una primera aproximación nos la proporcionaron los resultados obtenidos en el ensayo de dos híbridos en levadura. En este ensayo preliminar se empleó un mutante de delección de la proteína XIAP que carecía de su dominio RING para eliminar la numerosas interacciones debidas a la actividad E3 ubiquitín ligasa de este dominio RING. El uso de este mutante en el cribado inicial nos permitió partir de la premisa que la región que incluye los dominios BIR1-3 son suficientes para la interacción de FAF1 con XIAP. Esta hipótesis se contrastó mediante ensayos colorimétricos en levaduras e inmunoprecipitación, enfrentando a FAF1 con diferentes mutantes de XIAP. Aunque estos experimentos confirmaron que los dominios BIR1-3 interaccionan con FAF1, los dos métodos proporcionaron una información contradictoria: según los ensayos de actividad de β -galactosidasa (ensayos colorimétricos en levaduras), FAF1 sólo requiere la región que contiene los dominios BIR1 y BIR2 para interaccionar con XIAP, mientras que, según los ensayos de inmunoprecipitación, FAF1 sólo interacciona si conserva los 3 dominios BIR (BIR1-3). Esta discrepancia es probablemente debida a la distinta especificidad y sensibilidad de ambos ensayos. Por una parte, los ensayos de

actividad de β -galactosidasa dependen de la activación de la transcripción producida por la interacción entre proteínas de fusión artificiales (en nuestro caso, XIAP-BD y FAF1-AD) en el interior del núcleo. En general estos ensayos son muy sensibles pero pueden detectar interacciones que no ocurren en proteínas nativas, con plegamientos distintos a los de las proteínas de fusión. Por su parte, los ensayos de inmunoprecipitación se basan en la interacción directa entre proteínas nativas y, por tanto, son muy específicos, aun a costa de reducir su sensibilidad (Iwabuchi, Li et al. 1993; Phizicky and Fields 1995; Rao, Srinivas et al. 2014). Teniendo en cuenta las características de ambos ensayos, hemos optado por una aproximación conservadora, considerando que la interacción con FAF1 se produce en la región que se extiende sobre los dominios BIR1 a BIR3 de XIAP, tal y como la observamos en los ensayos con proteínas nativas.

El número de proteínas conocidas que requieren de los 3 dominios BIR para interactuar con XIAP sólo incluye actualmente a Survivina (Dohi 2004) y al receptor TGF β -RI (Reffey 2001). La información disponible en la bibliografía no indica que estas interacciones alteren la actividad de XIAP, es más, la interacción con survivina aumenta su estabilidad, evitando su ubiquitinación probablemente mediante el bloqueo de la unión de la proteína E2 ubiquitín transferasa UbCH5 a XIAP (Dohi 2004). Por el contrario, XIAP si puede actuar sobre estas proteínas o sobre su señalización, fundamentalmente a través de su actividad E3 ubiquitín ligasa. Así, la interacción de XIAP con Survivina parece mediar en la ubiquitinación y degradación de esta última cuando se sobreexpresa la proteína XAF1 (Arora, Cheung et al. 2007), mientras que la interacción de XIAP con el receptor 1 de TGF β le permite inhibir la apoptosis iniciada por TGF β mediante la ubiquitinación de TAK1 (Kaur, Wang et al. 2005). Estas observaciones son coherentes con los resultados que hemos obtenido en la presente tesis ya que, como se discutirá mas adelante, la interacción de FAF1 con XIAP a través de sus 3 dominios BIR no parece alterar las funciones de XIAP pero causa la ubiquitinación de FAF1 y su degradación.

Si extendemos el análisis de los efectos de XIAP sobre otras proteínas a aquellas que interactúan con alguno de sus dominios BIR y no estrictamente con los 3 al mismo tiempo, además de su actividad como ubiquitín ligasa, XIAP resulta capaz de regular la actividad de diferentes proteínas directamente a través de sus dominios BIRs.

Así, la interacción del dominio BIR2 y la región peptídica entre los dominios BIR1 y BIR2 con el dominio catalítico de las caspasas 3 y 7 bloquea la unión de estas proteasas con sus proteínas dianas (Abhari and Davoodi 2010). Por su parte, el dominio BIR3 interacciona con la caspasa 9, tanto con su forma pro-caspasa evitando su dimerización y activación (Shiozaki, Chai et al. 2003), como con el motivo amino-terminal del péptido de unión de la subunidad pequeña (subunidad P12) que queda expuesto tras el corte de la caspasa 9, evitando así la actividad proteasa (Deveraux, Leo et al. 1999; Zou, Yang et al. 2003). Además de la vía de apoptosis, XIAP también interacciona a través de sus dominios BIR a proteínas implicadas en otras vías (por ejemplo, AKT o RIPK2).

En sentido opuesto, la unión de los dominios BIR2 y BIR3 a diversas proteínas pro-apoptóticas con dominios IBM (*IAP Binding Motif*) procedentes del espacio intermembrana de la mitocondria permite regular la actividad de XIAP (Galban and Duckett 2010). Por ejemplo, el factor pro-apoptótico SMAC/DIABLO tiene una alta afinidad por los dominios BIR2 y BIR3, secuestrando a XIAP y evitando que se una e inhiba a caspasa 9 y a las caspasas efectoras (Huang, Wu et al. 2013). Según algunos estudios, esta interacción serviría a XIAP para ubiquitinar a SMAC/DIABLO mediante su dominio RING (MacFarlane, Merrison et al. 2002). Todos estos ejemplos ponen de manifiesto el amplio abanico de efectos que la interacción de FAF1 con los dominios BIR de XIAP podría tener, tanto sobre FAF1 como sobre los procesos que regula XIAP.

Además, el descubrimiento de la interacción de FAF1 con los dominios BIR1-3 de XIAP añade nuevos dominios de interacción de FAF1 (Introducción, tabla I3 de interacciones FAF1). Dado que los dominios BIR1-3 están presentes en los miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis cIAP1, cIAP2 y NAIP, es posible que FAF1 pueda interactuar con estas proteínas. Es más, si atendemos a los resultados de los ensayos de interacción en levaduras, las potenciales interacciones se extenderían a otras IAPs que incluyeran los dominios BIR 1 y BIR2. Esta posibilidad plantea nuevas vías de regulación de la apoptosis a diferentes niveles que será interesante analizar en posteriores análisis.

Por otro lado, los estudios de inmunoprecipitación de XIAP con distintos mutantes truncados del factor apoptótico FAF1 nos han permitido establecer que la unión se produce en la región FID-NtDEDID de FAF1. De hecho, los estudios realizados indican

estrictamente que la interacción depende de la región NtDEDID pero no son concluyentes a la hora de establecer si esta región por sí misma puede establecer la interacción o requiere de parte o del total del dominio FID. El dominio DEDID es fundamental para la actividad de FAF1 dentro de la vía apoptótica mediada por el receptor Fas/CD95. A través de este dominio, FAF1 interactúa con FADD y caspasa 8 para estabilizar el complejo DISC y promover la dimerización y activación de esta caspasa iniciadora (Ryu, Lee et al. 2003). El dominio DEDID también es necesario para la regulación la vía de supervivencia de NF- κ B, dado que a través de él FAF1 interactúa con p65, secuestrándole en el citoplasma y evitando su traslación al núcleo tras la activación de la vía (Park, Jang et al. 2004). Asimismo, FAF1 emplea este dominio para regular el ciclo celular degradando la proteína Aurora-A, un quinasa fundamental durante los procesos de mitosis y meiosis (Olsen, Jessen et al. 2003; Jang, Sul et al. 2008). Esta última proteína tiene además una función de regulación sobre FAF1 induciendo la fosforilación de las 2 serinas situadas en el dominio DEDID (Jang, Sul et al. 2008). Otra quinasa relacionada con el ciclo celular, CK2, también promueve la fosforilación de las serinas mencionadas promoviendo la localización nuclear de FAF1 (Olsen, Jessen et al. 2003). La unión de XIAP en el mismo dominio de FAF1 implicado en las interacciones mencionadas puede suponer una interferencia en estas uniones, provocando una pérdida de las funciones de FAF1 o de su regulación. Además XIAP podría regular a otras proteínas que compartieran el mismo dominio de interacción de FAF1, sin embargo, la búsqueda de secuencias peptídicas con homología al dominio DEDID mediante la herramienta informática BLAST no identificó ningún candidato plausible fuera de FAF1 y diversos fragmentos del mismo.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la región de unión entre las proteínas XIAP y FAF1 se produce entre los dominios BIR de la proteína XIAP y el dominio DEDID (potencialmente junto con el dominio FID) de la proteína FAF1. Para precisar la estructura tridimensional de ambas proteínas y la secuencia peptídica de unión entre XIAP y FAF1 sería necesario un estudio cristalográfico detallado. La localización de la interacción en estos dominios plantea la posibilidad de que FAF1 tenga un papel regulador sobre la actividad antiapoptótica de XIAP al interactuar sobre la región que comprenden los dominios BIR, como hacen otras proteínas pro-apoptóticas que antagonizan a XIAP (SMAC/DIABLO, Omi/Htra2,...). Por otro lado, también plantea

la posible regulación de XIAP sobre la acción del dominio DEDID de la proteína FAF1, implicado en la promoción de vías de muerte celular y bloqueo de la supervivencia.

7.4. XIAP ubiquitina a FAF1

Además de los dominios relacionados con la regulación de la muerte celular, ambas proteínas contienen dominios relacionados con los sistemas de ubiquitinación. En particular, XIAP contiene un dominio RING con actividad E3 ubiquitín ligasa capaz de unirse a enzimas E2 ubiquitín transferasa que le permite ubiquitinar proteínas tanto para su degradación como para señalización (Galban and Duckett 2010).

La presencia de este dominio plantea la posibilidad de que la interacción con FAF1 permita a XIAP actuar sobre FAF1 a través del sistema de ubiquitinación. Nuestros análisis de proteínas ubiquitinadas en presencia de XIAP o del mutante sin el dominio RING demostraron que FAF1 es marcado por XIAP mediante la unión de ubiquitinas. Estos experimentos demuestran además que el dominio RING es imprescindible para la ubiquitinación de FAF1, por lo que es XIAP, y no otra proteína que pudiera formar complejo con ambas la que se encarga de esta acción. Para evaluar el efecto de esta ubiquitinación sobre la estabilidad de FAF1, analizamos sus niveles endógenos en presencia de concentraciones de XIAP observando un descenso progresivo de FAF1. Estos resultados confirmaron que la ubiquitinación mediada por XIAP marca a FAF1 para su degradación proteosomal. Así pues, XIAP puede regular la actividad de FAF1 no sólo a través de su interacción con su dominio DEDID sino además a través de la regulación de sus niveles por ubiquitinación y degradación.

Los experimentos realizados no esclarecen el tipo de ubiquitinación que se produce en FAF1. Sin embargo, de los 8 tipos de unión de ubiquitinas conocidas, solo las producidas por unión en la Lisina 48 de la molécula de ubiquitina conlleva una degradación posterior en el proteosoma (Komander 2009). Debido a la disminución de los niveles endógenos de FAF1 asociados a concentraciones crecientes de XIAP mostrado en nuestros experimentos, podemos proponer que la unión con XIAP causa una ubiquitinación Lys 48 de FAF1. Esta posibilidad está apoyada por el modo de acción del dominio RING de XIAP. Dado su carácter E3 ligasa, este dominio requiere la unión a enzimas con actividad E2 ubiquitín transferasa para poder unir ubiquitinas a sus

sustratos. Como consecuencia el tipo de ubiquitinación resultante depende de la enzima E2 que se une al dominio RING. Según los estudios publicados, hasta la fecha sólo se ha demostrado la unión de XIAP con la E2 ubiquitin transferasa UbCH5 (Dohi 2004; Liu, Hsiao et al. 2007), que están asociadas a procesos de ubiquitinación Lys-48 con posterior degradación en el proteosoma (David, Ziv et al. 2010). De hecho, la degradación proteosomal es una de las principales formas de regulación de XIAP sobre las proteínas con las que interacciona que ha sido confirmada en sus interacciones con proteínas de la vía apoptótica como las caspasas, pero también con proteínas implicadas en otras vías, como PTEN y Mdm2 (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001; Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008; Galban and Duckett 2010). Sin embargo, XIAP también puede ubiquitinar sin causar la degradación de su sustrato. Esta posibilidad ha sido ilustrada en su interacción con Gro/TLE que causa la ubiquitinación de este componente de la vía de Wnt sin afectar su estabilidad pero sí su capacidad de unión a otros componentes (Hanson, Wallace et al. 2012). De hecho, ensayos de dos híbridos entre enzimas E2 y el dominio E3-RING plantean un escenario mucho más complejo, con miles de posibles interacciones, incluyendo múltiples E2 ubiquitin transferasas que resultan en ubiquitinaciones Lys-63, Lys-11, etc asociadas a señalización y degradación no dependiente del proteosoma (Markson, Kiel et al. 2009). Por tanto, podemos concluir que la ubiquitinación de FAF1 mediada por XIAP causa su degradación posiblemente por ubiquitinación Lys-48, regulando de esta manera la concentración de FAF1. Sin embargo, no podemos descartar que su interacción cause otros tipos de ubiquitinación y otros efectos adicionales (como señalización).

7.5. Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP en la citoprotección mediada por XIAP.

Como han mostrado nuestros resultados, la región de unión de XIAP con FAF1 comprende los dominios BIR de XIAP, responsables del bloqueo de las caspasas y de la función citoprotectora de XIAP. Estos dominios son también la región de unión de proteínas que regulan la actividad de XIAP como SMAC/Diablo, Omi/HtrA2, XAF1, GSPT1 o ARTs (Galban and Duckett 2010; Garrison, Correa et al. 2011). Teniendo en cuenta estos precedentes, planteamos la hipótesis de que la interacción de FAF1 con XIAP podría regular la actividad citoprotectora de XIAP, bloqueando o entorpeciendo su actividad sobre las caspasas como hacen otros reguladores de XIAP. Para contrastar

esta hipótesis procedimos a valorar la actividad citoprotectora de XIAP ante diferentes estímulos y el efecto de FAF1 sobre esta actividad.

Inicialmente empleamos el analizador automático GE-InCell que permite adquirir información morfológica de cientos de células individuales en cada pocillo de cultivo de forma automatizada, proporcionando una gran cantidad de datos sobre la morfología de las células durante el proceso apoptótico. Estos ensayos confirmaron la actividad citoprotectora de XIAP frente al tratamiento con estaurosporina, un estímulo apoptótico dependiente e independiente de caspasas (Belmokhtar, Hillion et al. 2001; Feng and Kaplowitz 2002). En estas condiciones, la sobreexpresión de FAF1 sólo fue capaz de atenuar la actividad citoprotectora de XIAP cuando se transfectó en una proporción 3 a 1 respecto a XIAP. En principio, estos resultados indicarían que FAF1 tiene un bajo o nulo efecto sobre la citoprotección de XIAP. Sin embargo, este estudio no proporcionó conclusiones claras, siendo incapaz de detectar la actividad pro-apoptótica de FAF1 bajo estimulación con estaurosporina descrita por autores previos (Park, Ryu et al. 2005). Estas dificultades se deben al sesgo en las células analizadas en los cultivos. Uno de los procesos más tempranos que ocurren tras la activación de la apoptosis es la pérdida de adhesión a la placa, de forma que toman una forma redondeada o incluso separada de la superficie. Dado que este sistema restringe su análisis a las células presentes en un plano focal definido, resulta imposible analizar a un tiempo las células que se mantienen adheridas y aquellas que se han separado o están en proceso de separarse. Esta limitación explicaría porque no se detectó el efecto pro-apoptótico de FAF1 ya que no consideraría las células despegadas. De hecho, el número de células totales detectadas en los pocillos con sobreexpresión de FAF1 era sistemáticamente menor que en los controles correspondientes. Es más, observaciones aisladas demostraron la presencia de estas células flotando en el medio de cultivo. Por tanto, estos estudios parecían indicar que FAF1 no bloqueaba de forma eficiente la citoprotección de XIAP pero no de forma concluyente.

Para evitar la pérdida de información debida a las células despegadas, repetimos los experimentos empleando análisis de citometría de flujo tras un marcaje nuclear que permite caracterizar el ciclo celular e cuantificar las células en proceso de apoptosis y las muertas. Coherentemente con los resultados obtenidos con el sistema InCell, estos análisis confirmaron el efecto citoprotectivo de la transfección con XIAP, que reduce la

población de células apoptóticas en cultivos tratados y sin tratar con estaurosporina. Sin embargo, a diferencia de los ensayos previos, los análisis de citometría confirmaron que la transfección con FAF1 induce muerte celular en cultivos sin tratar con estímulos apoptóticos. Este resultado coincide con los estudios de Ryu y Kim (Ryu and Kim 2001) en células BOCS23, donde se demostró que la sobreexpresión de FAF1 ocasiona muerte con activación de caspasa 3, pero sin la participación de Fas/CD95. Los resultados de los análisis de cultivos transfectados con ambas proteínas también proporcionaron un resultado diferente al obtenido con el sistema InCell, ya que tanto en cultivos estimulados con estaurosporina como en los no estimulados, se aprecia que la cotransfección con FAF1 aumenta la proporción de células muertas respecto a XIAP, particularmente cuando la transfección se realizó con un ratio FAF1:XIAP de 2:1. Estos resultados confirman los efectos contrapuestos de ambas proteínas y podrían interpretarse como que la interacción de ambas reduce el efecto citoprotector de XIAP. No obstante, estos resultados también pueden resultar del balance de las funciones independientes de XIAP y FAF1 en la vía de muerte celular sin ser preciso el efecto de su interacción. Además, estos ensayos de citometría aunque incorporaron la información del total de la población celular, no incorporaban medidas del nivel de transfección de las proteínas en cada célula individual. Como consecuencia, en estos estudios se combina la información de células con diferentes niveles de expresión de ambas proteínas, desde aquellas que no se han transfectado con ninguna de las dos, a otras con elevados niveles de transfección de una sola de las proteínas hasta aquellas realmente interesantes, donde ambas proteínas tienen niveles de transfección elevados. Esta diversidad en la población celular analizada causa que los valores de supervivencia calculados provengan de poblaciones dispares, impidiendo llegar a una conclusión definitiva sobre el efecto de FAF1 sobre la acción de XIAP.

Para subsanar este problema completamos el análisis de los efectos de la interacción con un estudio posterior de la morfología nuclear mediante inmunocitoquímica con células marcadas contra XIAP Y FAF1. A diferencia de los métodos previos, esta metodología nos permitió el estudio individualizado de las células con un nivel de expresión similar de ambas proteínas. Los resultados de estos análisis volvieron a confirmar que la sobreexpresión de FAF1 conduce al aumento de muerte celular, mientras que la sobreexpresión de XIAP resulta citoprotectora. Sin embargo, a diferencia de los estudios de citometría donde la citoprotección de XIAP se ve atenuada

por la sobreexpresión de FAF1, en estos estudios se apreció claramente que esta proteína no es capaz de reducir los niveles de supervivencia inducidos por XIAP tanto en ausencia como en presencia del estímulo apoptótico. Adicionalmente, se emplearon análisis de colocalización para evaluar si FAF1 era capaz de provocar una redistribución intracelular de XIAP, que podría asociarse con un debilitamiento de su actividad citoprotectora como se ha descrito tras la interacción de XIAP con XAF1 (Arora, Cheung et al. 2007). Estos análisis ratificaron la falta de actividad de FAF1 sobre XIAP, ya que la distribución intracelular de XIAP no se ve alterada por la sobreexpresión de FAF1, tanto en ausencia como en presencia del estímulo apoptótico. Una confirmación adicional se obtuvo a través de ensayos bioquímicos de la actividad de caspasas 3 y 7. Estos ensayos muestran que la disminución de los niveles de activación de las caspasas debida a XIAP no se revierte en presencia de FAF1. Aunque esta falta de efecto de FAF1 podría deberse a su ubiquitinación y degradación mediada por XIAP, experimentos adicionales con el mutante de XIAP que carece del dominio RING con actividad E3 ubiquitín ligasa mostraron que FAF1 tampoco modifica su inhibición de las caspasas 3 y 7.

Todos estos experimentos demuestran de forma concluyente que la interacción entre FAF1 y XIAP no permite al primero alterar los efectos citoprotectores de XIAP, ni bloqueando su actividad inhibitoria de caspasas ni alterando su distribución celular. Esta falta de efecto sobre la actividad citoprotectora de XIAP es similar a la descrita en otras proteínas que interactúan con XIAP, como el factor pro-apoptótico mitocondrial AIF (Wilkinson, Wilkinson et al. 2007) a diferencia de lo observado con diversas proteínas mitocondriales. De hecho, según sus efectos sobre la actividad citoprotectora de XIAP se pueden distinguir diferentes tipos de interacción de XIAP con proteínas proapoptóticas. Las más conocidas son las interacciones con proteínas con dominio de unión a IAPs (IBM) como SMAC, HtrA2 o GSPT1 caracterizadas por la presencia de una alanina en su extremo N-terminal que les permite unirse a las regiones de unión de XIAP con las caspasas y evitar su bloqueo (Vaux and Silke 2005). Otras proteínas, al carecer de dominios IBM, son incapaces de bloquear la unión de XIAP a caspasas, pero favorecen la actividad de estas proteasas y la apoptosis, promoviendo la degradación de XIAP mediante ubiquitinación como en el caso de ARTS (Bornstein, Gottfried et al. 2011). Un mecanismo similar se ha propuesto para la proteína XAF1, capaz de reducir los efectos citoprotectores de XIAP induciendo su traslado a núcleo y reduciendo sus

niveles activos en el citoplasma, aunque XAF1 también es capaz de inhibir directamente la actividad anti-caspasa de XIAP (Liston, Fong et al. 2001). Finalmente, otras proteínas, como AIF y posiblemente FAF1 según nuestros resultados, aunque participan en la activación de procesos de muerte celular e interaccionan con los dominios BIR de XIAP, no tienen capacidad para interferir en su actividad citoprotectora dentro de la vía de apoptosis (Wilkinson, Wilkinson et al. 2007).

7.6. Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la muerte mediada por FAF1 y la activación de la vía de Fas/CD95

FAF1 induce la muerte apoptótica fundamentalmente a través de sus interacciones con componentes del complejo DISC de la vía extrínseca de apoptosis activada por FasL (Ryu and Kim 2001). Así, tras la activación de Fas/CD95 por la unión de su ligando FasL, la interacción del dominio FID de FAF1 con el receptor Fas/CD95 (Ryu, Chae et al. 1999) y de su dominio DEDID con la proteína adaptadora FADD y la caspasa 8 (Ryu, Lee et al. 2003) favorece la estabilidad del complejo DISC y la activación de la caspasa 8. No obstante, FAF1 también es capaz de inducir la muerte celular independientemente de la activación de esta vía, como demostraron Ryu et al. (Ryu, Lee et al. 2003) con un mutante truncado de la proteína FAF1 sin dominio FID. Teniendo en cuenta que XIAP interacciona con el dominio DEDID de FAF1, hipotetizamos que a través de esa interacción XIAP podría regular la actividad apoptótica de FAF1 dependiente e independiente de la activación del receptor Fas/CD95.

Para evaluar el efecto de XIAP sobre la apoptosis inducida por FAF1 sin mediación de FasL, inicialmente confirmamos que la sobreexpresión de FAF1 era capaz de inducir la muerte celular por sí misma. Los resultados de nuestros análisis de citometría de flujo y inmunocitoquímica demuestran que la sobreexpresión de FAF1 produce un incremento de la muerte celular en las líneas celulares HEK293T y HeLa. Esta muerte se produce por mecanismos caspasa dependiente, con incremento del procesamiento de la procaspasa 8 y la activación de las caspasas efectoras. Este resultado coincide con observaciones previas en distintas líneas celulares (Ryu, Chae et al. 1999; Ryu and Kim 2001; Park, Ryu et al. 2005; Betarbet, Anderson et al. 2008; De Zio, Ferraro et al.

2008). Hay diferentes mecanismos que pueden explicar la activación de la apoptosis por la sobreexpresión de FAF1 sin la activación del receptor Fas/CD95 por su ligando FasL. En primer lugar, el receptor Fas/CD95 puede agregarse sin unión de su ligando, dando lugar a la formación intracelular del complejo DISC y la consecuente activación de caspasa 8 (Peter and Krammer 2003; Mollinedo and Gajate 2006; Lavrik and Krammer 2011). Por otro lado, FAF1 también puede mediar en la formación de un complejo similar al DISC sin el receptor Fas/CD95 que sensibiliza a la célula frente a estímulos citotóxicos como estaurosporina o cisplatino (Park, Ryu et al. 2005). Este proceso va asociado a la formación de unos filamentos denominados *Death Effector Filaments* (DEFs) compuestos por una isoforma de caspasa 8 que sólo contiene los dominios DEDs, la proteína adaptadora FADD y FAF1 (Yuan, Young et al. 2012). Sin embargo, este posible mecanismo no parece ser el responsable de la muerte inducida por FAF1 en nuestros experimentos ya que no hemos observado estos filamentos en las células, incluso tras estimulación con estaurosporina (resultados adicionales no mostrados). La razón más plausible de esta discrepancia con Park y colaboradores (Park, Ryu et al. 2005) es la falta de la isoforma truncada de caspasa 8 en nuestros cultivos celulares, máxime teniendo en cuenta que Park y colaboradores requieren su sobreexpresión para detectar los DEFs. Finalmente, la muerte celular inducida por la sobreexpresión de FAF1 también podría deberse a una posible contribución en la formación del complejo II del receptor TNFR1, compuesto principalmente por FADD y caspasa 8 (Schutze, Tchikov et al. 2008). Sin embargo, no tenemos ninguna evidencia de que la participación de FAF1 en este proceso haya sido demostrada hasta la fecha.

En estas condiciones, nuestros ensayos de citometría de flujo así como los análisis de la morfología nuclear demuestran que la sobreexpresión de XIAP bloquea completamente el proceso de muerte inducido por FAF1 sin activación de Fas/CD95. Dado que este proceso es dependiente de caspasa, el efecto citoprotectivo de XIAP podría deberse a la inhibición de la actividad de las caspasas efectoras, pero también por su interacción con FAF1. Aunque los resultados no son completamente concluyentes, los estudios de *western-blot* de caspasa 8 muestran que su procesamiento se reduce tras la sobreexpresión de XIAP (tanto en los niveles de pro-caspasa 8 como en los niveles de caspasa 8 procesada), indicando la actividad de XIAP también se produce a un nivel previo a la activación de las caspasas efectoras. Este resultado apoya la posibilidad de que XIAP regule la actividad de FAF1 a través de su interacción, aunque serían

necesarios otros ensayos adicionales para confirmarlo. En este sentido, se realizaron varios experimentos con ensayos de actividad de caspasa 8 e inmunoprecipitación de FAF1 y caspasa 8 en presencia de XIAP. Desafortunadamente, las limitaciones técnicas de estos ensayos (en el caso de los ensayos de actividad, debidas a la labilidad del sustrato que impide registrar la actividad en su máximo cuando las diferencias son más notorias y en el caso de la inmunoprecipitación, por la presencia de bandas inespecíficas con peso molecular similar a caspasa 8) impidieron alcanzar resultados interpretables.

Los ensayos con células estimuladas con un agonista de FasL (el anticuerpo contra Fas/CD95) aportaron información adicional que apoya la reducción de la actividad apoptótica de FAF1 tras su interacción con XIAP. Los cultivos de la línea celular Hela estimulados con anti-CD95/FasL confirmaron que XIAP es capaz de bloquear la vía extrínseca de Fas/CD95, incluso tras la sobreexpresión de FAF1. La capacidad de XIAP para bloquear esta vía ya ha sido demostrada en estudios previos con cultivos de hepatocitos (Jost, Grabow et al. 2009), sin embargo, nuestros resultados demuestran que XIAP mantiene su capacidad citoprotectora frente a esta vía aun con niveles elevados de FAF1 que favorecen claramente la apoptosis. Al igual que en los estudios sin activación de Fas/CD95, la sobreexpresión de XIAP causó la reducción del procesamiento de las caspasas efectoras 3 y 7, el bloqueo de su actividad y de la degradación de sus sustratos (PARP). Igualmente, la interpretación de estos resultados es ambivalente: XIAP podría modular la vía actuando directamente sobre las caspasas efectoras 3 y 7 o sobre la caspasa iniciadora 9 (como potenciadora de la acción de la vía extrínseca inducida por Fas/CD95) y/o interfiriendo en el acomplejamiento de la proteína FAF1 con el complejo DISC a través de su interacción con esta proteína. La contribución de la interacción XIAP-FAF1 se confirmó a través del análisis de actividad de la caspasa 8. Estos ensayos confirman que la sobreexpresión de FAF1 activa la vía de Fas/CD95 aumentando la actividad de la caspasa 8 y que esta inducción se reduce hasta valores por debajo de los controles cuando se sobreexpresa XIAP al mismo tiempo. Coherentemente, FAF1 aumenta el procesado de caspasa 8 causando un descenso de su pro-caspasa que es revertido por la cotransfección con XIAP. No obstante, no se aprecian las diferencias en los niveles de caspasa 8 procesada que se observaban en las células sin estimular. Aunque no tenemos una explicación para este fenómeno, es interesante constatar que ocurre de forma similar en la caspasa 3, uno de las dianas más conocidas de XIAP. Los *western-blot*s contra esta caspasa mostraron un notorio

aumento de sus formas procesadas tras la transfección con FAF1 que no se redujeron tras la cotransfección con XIAP, aunque si aumentaron los niveles de pro-caspasa 3.

La interacción de XIAP con FAF1 podría representar una posible forma de regulación del complejo DISC, sobre todo teniendo en cuenta que XIAP no interacciona con caspasa 8 (Eckelman, Salvesen et al. 2006) y, según las evidencias hasta la fecha, con ninguno de los demás componentes del complejo DISC. Teniendo en cuenta la región de interacción de ambas proteínas, XIAP podría interferir en la interacción del dominio DEDID de FAF1 con los dominios DED de caspasa 8 y/o FADD, contribuyendo a desestabilizar el complejo DISC y evitando el reclutamiento de caspasa 8 para su activación. Algo similar ocurre en otros sistemas de regulación negativo de la actividad de DISC descritos hasta la fecha. Así, el dominio CARD de la proteína ARC (*Apoptosis Represor with CARD*) le permite interaccionar con los distintos componentes del complejo DISC evitando la formación del complejo (Koseki, Inohara et al. 1998; Nam, Mani et al. 2004), mientras que el análogo inactivo de caspasa 8 cFLIP evita el desencadenamiento del proceso apoptótico desde el complejo DISC al formar dímeros con la caspasa 8 reduciendo su activación (Safa 2012). Serían necesarios ensayos adicionales para determinar si la interacción de FAF1 con caspasa 8 o FADD se ve alterada por la presencia de XIAP. Sin embargo, en varios experimentos no hemos podido valorar el nivel de interferencia de XIAP sobre la interacción FAF1-caspasa 8 ya que no hemos conseguido replicar los estudios de inmunoprecipitación entre caspasa 8 y FAF1 de Ryu y colaboradores (Ryu, Lee et al. 2003). Alternativamente, XIAP podría interferir en la actividad pro-apoptótica de FAF1 mediante la regulación de su abundancia a través del marcaje mediante ubiquitinación y degradación por el proteosoma, tal y como hemos discutido anteriormente y como se ha descrito en la regulación de las caspasas maduras 3, 7 y 9 (Deveraux, Takahashi et al. 1997; Datta, Oki et al. 2000; Schile, Garcia-Fernandez et al. 2008).

De forma coherente con los resultados de los ensayos bioquímicos y de muerte celular, la interacción con XIAP también parece alterar la distribución celular de FAF1. Estos resultados muestran que la activación de la vía Fas/CD95 no altera la distribución celular de FAF1, en tanto que su sobreexpresión solo induce un marcaje fuerte y homogéneo por toda la célula excepto el núcleo, que se mantiene aun tras activar la vía Fas/CD95. Estos resultados contrastan con la redistribución de FAF1 desde la

membrana al citoplasma tras la estimulación del receptor Fas/CD95 que observaron Ryu y colaboradores (Ryu, Lee et al. 2003). Esta disparidad posiblemente se deba a diferencias en las características de las células empleadas, Hela en nuestro caso y Jurkat en su caso. Sin embargo, el resultado más interesante que hemos observado se produce cuando se sobreexpresa XIAP al tiempo que FAF1. En esta situación, tanto con o sin estimulación de la vía Fas/CD95, se observa que la señal de FAF1 es mucho más patente en la membrana frente al citoplasma. La estimulación de Fas/CD95 contribuye a destacar este patrón, con una progresiva disminución de la señal de FAF1, más aparente en el citoplasma según avanza el proceso apoptótico. Paralelamente, la estimulación altera progresivamente la contribución de ambas proteínas en las áreas de colocalización, de forma creciente en XIAP y decreciente en FAF1, aunque el nivel global de colocalización global se mantiene prácticamente constante con valores próximos a 0,9 (siendo 1 la total colocalización). Todos estos resultados demuestran que la interacción de XIAP causa una alteración de la distribución celular de FAF1 que podría guardar alguna relación con su inhibición o su ubiquitinación, aunque los resultados presentes no permiten definir dicha relación.

En resumen, los experimentos realizados demuestran que XIAP puede regular la vía apoptótica de Fas/CD95 así como la muerte inducida por FAF1, ya sea reduciendo los niveles de FAF1 por ubiquitinación o bloqueando su actividad. La posible regulación de la apoptosis en niveles previos a la activación de las caspasas efectoras y la permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) ya ha sido propuesta previamente por Wilkinson (Wilkinson, Cepero et al. 2004). Este autor mostró que XIAP bloquea la vía extrínseca mediada por Fas/CD95 a niveles por encima de la liberación de factores mitocondriales o la activación de caspasa efectoras de forma dependiente de la presencia de los dominios BIR1 y/o BIR2. La interacción de XIAP con la proteína FAF1 sería por tanto la responsable de esta regulación y permitiría a XIAP actuar indirectamente sobre la activación de la caspasa iniciadora 8 en la vía de Fas/CD95 o en la muerte inducida por FAF1 a nivel del complejo DISC.

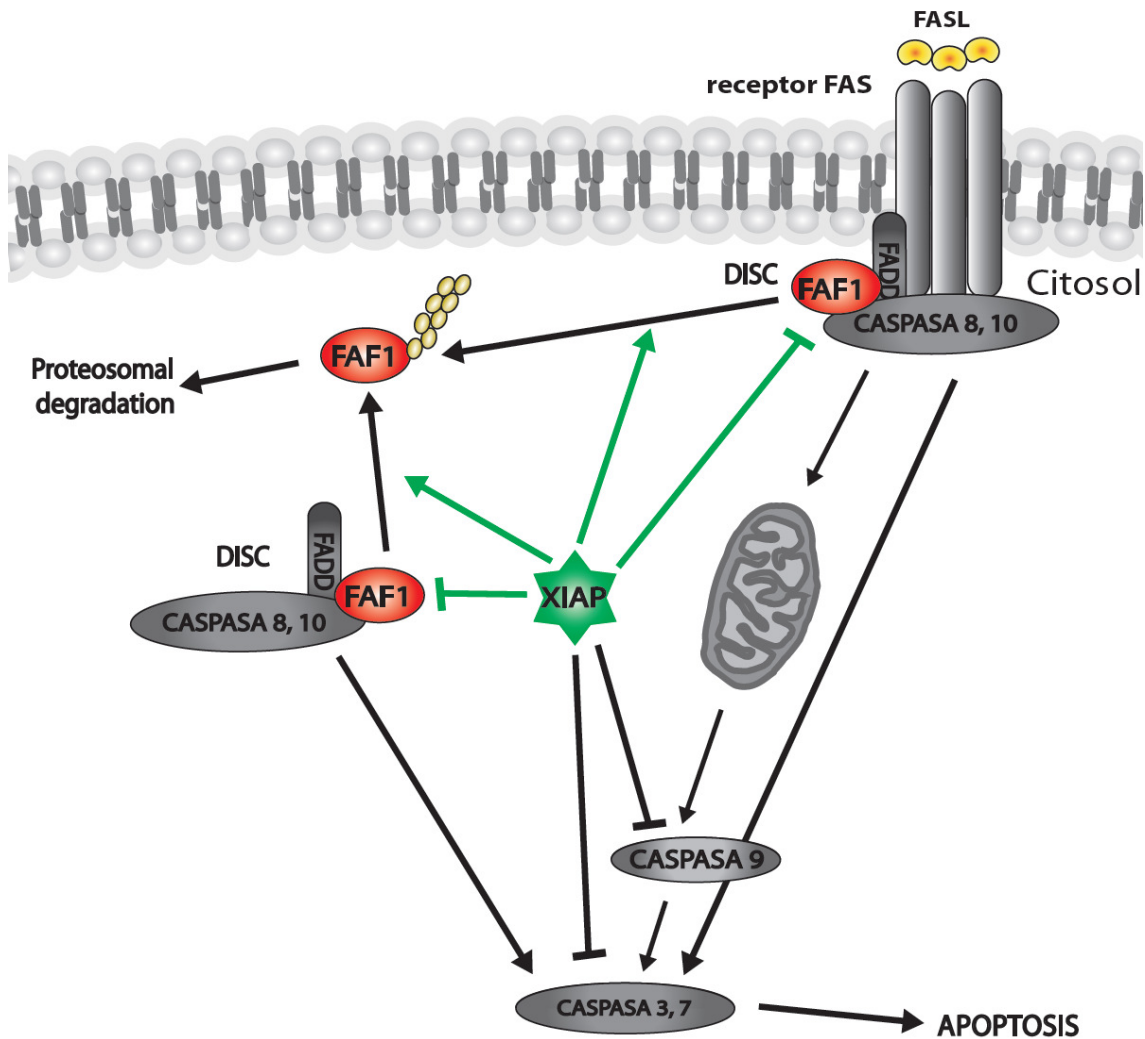


Figura D1. Esquema de la interacción XIAP-FAF1 en la vía de apoptosis. La formación del complejo DISC se produce por la activación del receptor Fas/CD95, pero también por la sobreexpresión de FAF1 con o sin participación del receptor no activado. La interacción de XIAP con FAF1, media la ubiquitinación y degradación del factor proapoptótico FAF1, inhibiendo la activación de caspasa 8 en el complejo DISC. Asimismo, la interacción de los dominios BIR de XIAP con FAF1 podría bloquear su unión a FADD y/o caspasa 8.

7.7. Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la activación de la vía NF- κ B inducida por XIAP

Además de su papel en la vía extrínseca de apoptosis, tanto FAF1 como XIAP coinciden en la modulación de la vía de supervivencia de NF- κ B, mediante la interacción con componentes a diferentes niveles de la vía (Hofer-Warbinek, Schmid et al. 2000; Lewis, Burstein et al. 2004; Park, Jang et al. 2004; Park, Moon et al. 2007; Kairisalo, Korhonen et al. 2009). Esta vía se activa por la unión de TNF α a su receptor TNFR1, que recluta en su región citoplasmática a las proteínas adaptadoras TRADD,

RIP1, TRAF 2/5 y cIAP 1/2. Estas proteínas crean una red de cadenas de poliubiquitina unidas por la Lys63 donde se reclutan los complejos de IKK junto con las proteínas TAB1 y TAK1 que los activan. Los complejos IKKs activados liberan a los factores de transcripción κ B (p50 y p65) de su inhibidor I κ B y de esta forma entran al núcleo para proteger a la célula mediante la transcripción de genes anti-apoptóticos, de proliferación y de respuesta inmunológica (Gupta 2002; Habelhah 2010).

Nuestros estudios iniciales de los efectos de la sobreexpresión de XIAP y FAF1 sobre la activación de la vía NF- κ B tras la estimulación con TNF α confirmaron la actividad contrapuesta de ambas proteínas. Sin embargo, dado que tanto XIAP como FAF1 intervienen en diferentes puntos de esta cascada de señalización, uno de nuestros objetivos ha sido evaluar si la activación final de NF- κ B depende de la acción independiente pero contrapuesta de FAF1 y XIAP sobre la vía o es el resultado de la interacción entre ambas proteínas.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la interacción sobre la actividad de XIAP. La sobreexpresión de XIAP induce la actividad de NF- κ B en HEK293T, particularmente cuando hay una estimulación extracelular con la citoquina TNF α , coherentemente con lo descrito en trabajos anteriores (Hofer-Warbinek, Schmid et al. 2000; Lewis, Burstein et al. 2004; Kairisalo, Korhonen et al. 2009). Cuando se sobreexpresan cantidades crecientes de FAF1, nuestros resultados demuestran que la inducción de la vía NF- κ B debida a la sobreexpresión de XIAP se atenúa de forma dosis dependiente, tanto en presencia como en ausencia de TNF α .

Teniendo en cuenta que, en ausencia de estimulación extracelular, XIAP es capaz de inducir la vía NF- κ B mediante la interacción a través de su dominio BIR1 con la proteína TAB1 (Park, Jang et al. 2004; Lu, Lin et al. 2007; Park, Moon et al. 2007), la reducción en la respuesta de NF- κ B cuando sobreexpresamos FAF1 podría deberse a un efecto directo de FAF1 sobre la interacción XIAP-TAB1, como se ha observado en la interacción de XIAP con SMAC/DIABLO y Siva. En el primer caso, SMAC/DIABLO se une a los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP inhibiendo la interacción entre XIAP y TAB1 por exclusión estérica (Lu, Lin et al. 2007), mientras que SIVA actúa mediante la unión al dominio RING de XIAP, favoreciendo su degradación (Resch, Schichl et al.

2009). Dado que FAF1 no se une al dominio RING de XIAP, se podría asemejar a SMAC/Diablo e interferir en la interacción XIAP-TAB1 en el dominio BIR1 de XIAP, donde también se une FAF1. Para contrastar esta posibilidad empleamos un mutante truncado de FAF1 sin la parte C-terminal de su dominio DEDID. Dado que la capacidad de FAF1 para interactuar con p65 secuestrándolo en el citoplasma depende de la integridad del dominio DEDID, este mutante nos permitió eliminar este efecto y evaluar únicamente los efectos de FAF1 mediados por su interacción con XIAP o por su efecto sobre el complejo IKK, dependiente del dominio FID (Park, Moon et al. 2007). Este mutante es capaz de atenuar ligeramente la actividad de la vía NF- κ B en condiciones control (sin estimulación con TNF α o sobreexpresión de XIAP) demostrando un mínimo efecto sobre el complejo IKK. Sin embargo, tras la sobreexpresión de XIAP, el mutante no causó ninguna reducción en la activación de la vía. Por tanto, el mutante no parece evitar la interacción XIAP-TAB1, aun siendo capaz de unirse con XIAP en la misma región. Los análisis de inmunoprecipitación de XIAP y TAB1 en presencia de concentraciones crecientes de FAF1 confirmaron la falta de efecto de FAF1 sobre esta interacción. Por tanto, concluimos que la interacción de XIAP con FAF1 en sus 3 dominios BIR no altera la interacción XIAP-TAB1, aunque ésta dependa del dominio BIR1 de XIAP. Casos similares se han observado en la interacción de XIAP con las proteínas AIF y survivina. La primera se une a XIAP en el dominio BIR2 pero no impide la inhibición de caspasa 3 a pesar de compartir el mismo dominio de unión (Wilkinson, Wilkinson et al. 2007), mientras que survivina se une a los 3 dominios BIR de XIAP y no solo no interfiere su bloqueo de las caspasas sino que lo potencia (Dohi 2004).

7.8. Consecuencias de la interacción FAF1-XIAP sobre la inhibición de la vía NF- κ B inducida por FAF1

Dado que FAF1 no es capaz de bloquear la unión de XIAP con TAB1, el efecto atenuante de la proteína FAF1 observado en los experimentos iniciales debe resultar de su actividad directa sobre los complejos IKK o p65 contrarrestando la activación mediada por XIAP. Sin embargo, el efecto de la acción simultánea de ambas proteínas sobre la vía no es equilibrado, sino que se inclina claramente a favor de la acción estimuladora de XIAP. Si bien FAF1 es capaz de atenuar la activación inducida por XIAP, requiere concentraciones elevadas (con transfecciones de 3 veces más FAF1 que

XIAP), mientras que el efecto inhibitorio de FAF1 sobre la vía de NF- κ B es completamente bloqueado por la contransfección de niveles equivalentes de XIAP. Este resultado plantea la posibilidad de que XIAP no solo active y promueva la vía de NF- κ B, sino que a través de su interacción con FAF1 reduzca su actividad inhibitoria de la vía.

Nuestros resultados confirman que la sobreexpresión de la proteína FAF1 conduce a una inhibición de la vía NF- κ B, ya demostrada previamente por otros autores (Park, Jang et al. 2004). FAF1 inhibe la vía NF- κ B mediante dos mecanismos independientes, relacionados con dos de sus dominios. El dominio FID le permite inhibir la activación de NF- κ B mediante la desestabilización de los complejos IKK (Park, Moon et al. 2007), en tanto que el dominio DEDID secuestra en el citosol a RelA/p65 una vez liberado de I κ B (Park, Jang et al. 2004). Como ya hemos comentado, la sobreexpresión de XIAP invierte esta inhibición y favorece la activación de la vía NF- κ B, tanto en presencia como en ausencia de estimulación con TNF α .

Para establecer si este efecto depende de la interacción de XIAP con FAF1 o alternativamente del efecto directo de XIAP sobre la vía NF- κ B, empleamos un mutante truncado de XIAP carente del dominio RING (XIAP- Δ RING). XIAP necesita este dominio tanto para ubiquitinar a COMMD1 como para formar dímeros que le permitan unirse a las proteínas TAB1/TAK1 (Lewis, Burstein et al. 2004; Lu, Lin et al. 2007). Como consecuencia, la sobreexpresión de este mutante truncado no es capaz de activar la vía de NF- κ B en cultivos celulares (Lewis, Burstein et al. 2004), de forma que sus efectos sobre la actividad de NF- κ B tras la sobreexpresión de FAF1 solo pueden atribuirse a su interacción con esta proteína. En estas condiciones observamos que la sobreexpresión de XIAP- Δ RING conducen a una reducción parcial, aunque significativa, de la inhibición de NF- κ B inducida por FAF1 tras la estimulación con TNF α . Por tanto, XIAP reduce directamente la inhibición ejercida por FAF1 sobre la vía NF- κ B. Es importante señalar, que estos experimentos demuestran que la interacción XIAP-FAF1 bloquea directamente la actividad de FAF1 y no como consecuencia de la ubiquitinación de FAF1 mediada por XIAP, ya que ésta depende del dominio RING ausente en el mutante. Los experimentos adicionales de co-inmunoprecipitación y *western blot* demuestran que XIAP interfiere en la interacción

FAF1-RelA/p65 de una forma dependiente de la dosis de XIAP, reduciendo el secuestro citoplásmico de RelA/p65 y facilitando así el desplazamiento de RelA/p65 al núcleo. Estos resultados sugieren que la interacción de XIAP al dominio DEDID de FAF1 impiden la unión de este a RelA/p65 que tiene lugar en ese mismo dominio (Park, Jang et al. 2004).

Si bien los experimentos de sobreexpresión del mutante XIAP- Δ RING demuestran que la interacción XIAP-FAF1 reduce la inhibición de la proteína FAF1 sobre la vía NF- κ B, la interferencia no es capaz de restaurar los niveles de la vía en ausencia de transfección con FAF1. El efecto sobre FAF1 se incrementaría en la interacción con XIAP nativo, ya que además promovería la degradación de FAF1 a través de su ubiquitinación mediada por el dominio RING. Sin embargo, dado que el dominio RING también permite a XIAP activar y promover la señalización de NF- κ B, en las presentes condiciones resulta imposible establecer la contribución de la ubiquitinación a la inhibición de la actividad de FAF1.

En conjunto, nuestros resultados establecen que XIAP y FAF1 contribuyen a modular la vía TNF α -TNFR1-NF- κ B, tanto de una forma individual previamente caracterizada por numerosos autores, como mediante la interacción entre ambas, a través de la cual XIAP puede regular la inhibición de FAF1. De acuerdo con estos resultados, XIAP es la primera proteína identificada capaz de regular la actividad de FAF1 sobre la vía de NF- κ B. Esta nueva actividad se une a su capacidad para promover la señalización de la vía NF- κ B activando la vía a nivel del complejo TAB1-TAK (Lu, Lin et al. 2007), degradando del bloqueante COMMD1 para facilitar la transcripción de p50/p65 (Maine, Mao et al. 2007), ubiquitinando de MEKK2 para inducir una segunda ola de desplazamiento de NF- κ B al núcleo, que prolonga la activación de la vía (Winsauer, Resch et al. 2008), o posiblemente contribuyendo a la ubiquitinación de IKK γ en el reclutamiento del complejo IKK (Gyrd-Hansen, Darding et al. 2008).

su ubiquitinación como, interesantemente, a través del bloqueo directo de la actividad del dominio DEDID sobre p65 en la vía de NF- κ B y probablemente también en la estabilización del complejo DISC en la vía de Fas/CD95. La interacción de XIAP-FAF1 supone uno de los escasos mecanismos de regulación de FAF1 y añade a las conocidas funciones de XIAP la capacidad para reducir la activación de la vía apoptótica extrínseca de Fas/CD95 a niveles previos a la activación de las caspasas 3, 7 y 9, y favorecer el progreso de la vía NF- κ B activada por TNF α protegiendo a p65 de su secuestro en el citoplasma. Aunque las consecuencias fisiológicas y clínicas de esta interacción están por explorar, es posible hipotetizar potenciales implicaciones.

Los efectos de la interacción entre XIAP y FAF1 en la regulación de la muerte celular puede ser crítico en el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer. El papel de XIAP en los procesos cancerígenos está ampliamente documentado, con múltiples evidencias de una correlación entre los niveles de XIAP y la agresividad de los tumores malignos (Fong, Liston et al. 2000). De hecho, el aumento de la expresión o la actividad de XIAP está asociado a la progresión de muchos tumores humanos, actuando como factor quimiorresistente en células que carecen de sistemas de regulación de XIAP activos (Schimmer, Dalili et al. 2006; Seeger, Brinkmann et al. 2010). Por el contrario, el descenso de la expresión de FAF1 es característico de diversos procesos cancerosos, como en los carcinomas gástricos y de cervix humano o en el mesotelioma maligno, (Bjorling-Poulsen, Seitz et al. 2003; Hidalgo, Baudis et al. 2005). Dado el papel promotor de FAF1 en la apoptosis y su regulación negativa de la vía pro-supervivencia de NF- κ B, FAF1 podría actuar como supresor tumoral (Menges et al. 2009). De hecho, varios estudios han mostrado que el descenso de los niveles o actividad de FAF1 en estos carcinomas está asociado a una señalización aberrante de la vía NF- κ B, así como de la vía proteosomal también regulada por FAF1 (Sasaki, Morisaki et al. 2001; Yeh, Chuang et al. 2003; Sartore-Bianchi, Ricotta et al. 2007; Menges, Altomare et al. 2009). Aunque en múltiples casos, como en el carcinoma uterino o en el linfoma de células del manto, el descenso de la expresión de FAF1 está causado por pérdidas alélicas, en muchos otros tipos tumorales la causa no ha sido identificada (Menges, Altomare et al. 2009). En este sentido, es interesante constatar que tanto en el carcinoma gástrico como en el mesotelioma maligno el descenso de la expresión de FAF1 va parejo a un aumento de la expresión de XIAP (Tong, Zheng et al. 2005; Wu, Sun et al. 2007; Burstein, Idrees

et al. 2008; Shibata, Noguchi et al. 2008). Resulta tentador especular que la sobreexpresión de XIAP podría ser responsable, al menos parcialmente, del descenso de los niveles de FAF1, mediando en su ubiquitinación y degradación a través de la interacción identificada en este trabajo y contribuyendo a favorecer la supervivencia de las células tumorales. Por esta razón, el tratamiento de estos tumores con terapia génica debe realizarse teniendo en cuenta que un aumento de la expresión de FAF1 no sería eficaz si las concentraciones de XIAP están elevadas al mismo tiempo. En este sentido, sería más eficaz el silenciamiento de XIAP que podría tener como consecuencia un aumento de los niveles de FAF1, que permitiría a la célula una adecuada inducción de la muerte celular.

La interacción entre XIAP y FAF1 no solo es interesante en procesos tumorales, sino también en la comprensión y el tratamiento de patologías neurodegenerativas donde la pérdida de regulación de la muerte celular subyace a su etiología. En las patologías de Alzheimer y Parkinson se han descrito aumentos significativos de la expresión o actividad de FAF1 que podrían contribuir a los procesos de muerte de células neurales (Wang, Zhang et al. 2003; Betarbet, Anderson et al. 2008; Sul, Park et al. 2013). La participación de FAF1 es particularmente interesante en la enfermedad de Parkinson debido a su interacción con la proteína Parkin (Sul et al., 2013), un marcador de susceptibilidad al Parkinson que aparece mutado en las formas familiar y esporádica de esta enfermedad (Dawson y Dawson, 2010 para Parkin y mutaciones). Según se ha demostrado recientemente, Parkin tiene a FAF1 como sustrato de su actividad E3 ubiquitin ligasa, causando su ubiquitinación y degradación (Sul, Park et al. 2013). Sin embargo, los mutantes asociados al Parkinson pierden la capacidad de ubiquitinar y degradar a FAF1, causando que se acumule y, como consecuencia, que aumente la muerte celular a través de diferentes vías de señalización (Sul, Park et al. 2013). Por su parte, XIAP se ha empleado como citoprotector en diferentes modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el Parkinson (Musatov, Goldfein et al. 2005). Empleando mutantes truncados de XIAP, estos estudios atribuyen la actividad citoprotectora de XIAP a su actividad inhibitoria de las caspasas así como a su regulación de la actividad del proteosoma en modelos de Parkinson esporádico (Musatov, Goldfein et al. 2005). Según los resultados de la presente tesis, XIAP incorporaría su capacidad para reducir la actividad de FAF1 a estos efectos, sustituyendo la actividad E3 ubiquitin ligasa de Parkin y, por tanto, bloqueando una de

los principales moduladores de la enfermedad, de acuerdo con Sul y colaboradores (Sul, Park et al. 2013). Sin embargo, hay que considerar que se ha descrito un elevado grado de estrés nitrosativo (aumento de los niveles de óxido nítrico) en pacientes de Parkinson que causa la transnitrosilación tanto de parkin como de XIAP (Tsang, Lee et al. 2009; Nakamura, Wang et al. 2010), bloqueando su actividad E3 ubiquitín ligasa (Nakamura, Wang et al. 2010). Por tanto, esta modificación del dominio E3 impediría a XIAP reemplazar la actividad de parkin en este tipo de pacientes y pondría en cuestión la viabilidad del tratamiento de XIAP en pacientes de Parkinson. Sin embargo, la disparidad de modelos animales empleados (algunos basados en bloqueantes del proteosoma o en la sobreexpresión de α -sinucleína) y la diversidad de etiologías de esta enfermedad hacen necesarios estudios detallados para establecer las posibilidades y límites de una terapia basada en XIAP.

Adicionalmente, la interacción entre XIAP-FAF1 también puede tener importantes consecuencias en los procesos neurodegenerativos asociados a los traumas del sistema nervioso central. La apoptosis juega un papel fundamental en estas patologías siendo responsable en gran medida de las pérdidas funcionales que ocurren tras el trauma, como se ha observado en diversos modelos de lesión medular. Tras el trauma en médula espinal, se produce un aumento de la presencia de estímulos apoptóticos en la región dañada, incluyendo un aumento de los niveles de la citoquina $TNF\alpha$ y del ligando FasL asociado a la infiltración de células inmunes (Yoshino, Matsuno et al. 2004; Keane, Davis et al. 2006). Diversos estudios previos han demostrado que la activación de la vía extrínseca de apoptosis de Fas/CD95 por FasL contribuye de forma importante a la muerte de células neurales (D'Souza, Bonetti et al. 1996; Raoul, Estevez et al. 2002). Por otra parte, la lesión altera la vía de TNFR1, causando la degradación o el desacomplejamiento de componentes específicos del complejo I necesario para la activación de la vía de supervivencia de NF- κ B y promoviendo la formación del complejo alternativo II que promueva muerte celular dependiente de caspasa (ver resumen en Keane et al., 2006). En ambos procesos, tanto XIAP como FAF1 pueden jugar un papel importante. Aunque el papel de FAF1 no se ha publicado hasta la fecha, estudios de nuestro laboratorio muestran un aumento de su concentración en la médula lesionada, que podría contribuir tanto al bloqueo de la vía de NF- κ B como a la activación de la vía Fas/CD95 tanto de forma dependiente como independiente de la

presencia de FasL. Por su parte, la lesión medular induce el procesamiento de XIAP, con un corte entre BIR2 y BIR3, que puede disminuir su actividad tanto en la inhibición de la apoptosis como en la activación de la vía de NF- κ B (Keane, Kraydieh et al. 2001). Por tanto, terapias que incrementen los niveles locales de XIAP tras la lesión medular son particularmente interesantes ya que permitirían bloquear los procesos apoptóticos, al tiempo que activarían la vía de NF- κ B a través de la interacción con TAB1 incluso en ausencia del complejo I. En este contexto, la interacción de XIAP con FAF1 y su capacidad para bloquearlo permitiría reducir los efectos derivados de su sobreexpresión tras la lesión, inhibiendo el ensamblaje de los componentes del complejo DISC y evitando la progresión de la señal apoptótica de FasL, además de favorecer su actividad sobre la vía de NF- κ B al evitar el secuestro citoplasmático de p65 mediado por FAF1. De hecho, estudios de nuestro laboratorio con un fármaco bloqueante del inhibidor de XIAP Omi/HtrA2 así como con ratones transgénicos de sobreexpresión de XIAP en neuronas han mostrado una mayor recuperación funcional y una mayor preservación tisular tras la lesión medular asociada al aumento de la expresión de XIAP (Reigada, Nieto-Díaz et al. 2015); datos propios sin publicar). Sin embargo, el efecto de la interacción XIAP-FAF1 en estos tratamientos está aun por determinar y esperamos abordarlo en los próximos tiempos.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La proteína pro-apoptótica FAF1 interacciona con la proteína inhibidora de apoptosis XIAP en células eucariotas.

2. La unión se produce entre los dominios BIR de la proteína XIAP y la región de FAF1 que incluye los aminoácidos 200 a 276, que comprenden el extremo amino terminal del dominio DEDID.

3. Las proteínas endógenas XIAP y FAF1 colocalizan en el citoplasma y con menor intensidad en el núcleo de células humanas.

4. El dominio RING de XIAP marca a la proteína FAF1 con ubiquitinas, produciéndose su posterior degradación en el proteosoma, en células humanas HEK293T.

5. FAF1 no interfiere en la actividad citoprotectora de XIAP frente a estímulos apoptóticos como estaurosporina o a través del receptor Fas/CD95 en células humanas HeLa.

6. XIAP inhibe el procesamiento proteolítico y actividad de la caspasa iniciadora 8 y las caspasas efectoras 3 y 7 promovido por FAF1 en células humanas HeLa.

7. FAF1 no interfiere en la unión de XIAP a la proteína TAB1 en la activación de la vía NF- κ B inducida por XIAP en células humanas HEK293T. Por tanto FAF1 reduce la activación de la vía NF- κ B mediante su acción directa sobre la vía.

8. XIAP inhibe la acción inhibitoria de FAF1 sobre la vía NF- κ B mediante la interacción directa de sus dominios BIR y la degradación de FAF1 dependiente de la ubiquitinación, interfiriendo en la unión de FAF1 con la proteína p65.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abhari, B. A. and J. Davoodi (2008). "A mechanistic insight into SMAC peptide interference with XIAP-Bir2 inhibition of executioner caspases." J Mol Biol **381**(3): 645-654.
- Abhari, B. A. and J. Davoodi (2010). "BIR2 domain of XIAP plays a marginal role in inhibition of executioner caspases." Int J Biol Macromol **46**(3): 337-341.
- Adham, I. M., J. Khulan, et al. (2008). "Fas-associated factor (FAF1) is required for the early cleavage-stages of mouse embryo." Mol Hum Reprod **14**(4): 207-213.
- Andera, L. (2009). "Signaling activated by the death receptors of the TNFR family." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **153**(3): 173-180.
- Arora, V., H. H. Cheung, et al. (2007). "Degradation of Survivin by the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)-XAF1 Complex." Journal of Biological Chemistry **282**(36): 26202-26209.
- Asselin, E., G. B. Mills, et al. (2001). "XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells." Cancer Res **61**(5): 1862-1868.
- Aubert, G. and P. M. Lansdorp (2008). "Telomeres and aging." Physiol Rev **88**(2): 557-579.
- Autuori, F., M. G. Farrace, et al. (1998). "'Tissue' transglutaminase and apoptosis." Adv Biochem Eng Biotechnol **62**: 129-136.
- Baehrecke, E. H. (2002). "How death shapes life during development." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 779-787.
- Barber, G. N. (2001). "Host defense, viruses and apoptosis." Cell Death Differ **8**(2): 113-126.
- Barnhart, B. C., E. C. Alappat, et al. (2003). "The CD95 type I/type II model." Semin Immunol **15**(3): 185-193.
- Bea, S., I. Salaverria, et al. (2009). "Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling." Blood **113**(13): 3059-3069.
- Belmokhtar, C. A., J. Hillion, et al. (2001). "Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms." Oncogene **20**(26): 3354-3362.
- Betarbet, R., L. R. Anderson, et al. (2008). "Fas-associated factor 1 and Parkinson's disease." Neurobiol Dis **31**(3): 309-315.
- Bjorling-Poulsen, M., G. Seitz, et al. (2003). "The pro-apoptotic FAS-associated factor 1 is specifically reduced in human gastric carcinomas." Int J Oncol **23**(4): 1015-1023.
- Bolte, S. and F. P. Cordelieres (2006). "A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy." J Microsc **224**(Pt 3): 213-232.
- Bornstein, B., Y. Gottfried, et al. (2011). "ARTS binds to a distinct domain in XIAP-BIR3 and promotes apoptosis by a mechanism that is different from other IAP-antagonists." Apoptosis **16**(9): 869-881.
- Bortner, C. D., N. B. Oldenburg, et al. (1995). "The role of DNA fragmentation in apoptosis." Trends Cell Biol **5**(1): 21-26.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, et al. (2005). "Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis." Molecular and Cellular Biology **25**(3): 1025-1040.

- Brady, G. F., S. Galban, et al. (2010). "Regulation of the Copper Chaperone CCS by XIAP-Mediated Ubiquitination." Molecular and Cellular Biology **30**(8): 1923-1936.
- Brasier, A. R. (2006). "The NF-kappaB regulatory network." Cardiovasc Toxicol **6**(2): 111-130.
- Buchberger, A. (2002). "From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary." Trends Cell Biol **12**(5): 216-221.
- Burek, M. and R. Oppenheim (1999). "Cellular Interactions that Regulate Programmed Cell Death in the Developing Vertebrate Nervous System." Cell Death and Diseases of the Nervous System II: 145-179.
- Burstein, D. E., M. T. Idrees, et al. (2008). "Immunohistochemical detection of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cervical squamous intraepithelial neoplasia and squamous carcinoma." Ann Diagn Pathol **12**(2): 85-89.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Crook, N. E., R. J. Clem, et al. (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-2174.
- Crowe, M. J., J. C. Bresnahan, et al. (1997). "Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys." Nat Med **3**(1): 73-76.
- Czabotar, P. E., G. Lessene, et al. (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 49-63.
- Chai, J. and Y. Shi (2014). "Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation." National Science Review **1**(1): 101-118.
- Chan, F. K., H. J. Chun, et al. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-2354.
- Chautan, M., G. Chazal, et al. (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." Curr Biol **9**(17): 967-970.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-1635.
- Cheng, J., T. Zhou, et al. (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." Science **263**(5154): 1759-1762.
- Cheng, K., L. Bai, et al. (2011). "Fas-associated factor 1 as a regulator of olfactory axon guidance." J Neurosci **31**(33): 11905-11913.
- Chinnaiyan, A. M. (1999). "The apoptosome: heart and soul of the cell death machine." Neoplasia **1**(1): 5-15.
- Chu, K., X. Niu, et al. (1995). "A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11894-11898.
- D'Souza, S. D., B. Bonetti, et al. (1996). "Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death." J Exp Med **184**(6): 2361-2370.
- Damgaard, R. B., B. K. Fiil, et al. (2013). "Disease-causing mutations in the XIAPBIR2 domain impair NOD2-dependent immune signalling." EMBO Molecular Medicine **5**(8): 1278-1295.
- Dan, H. C. (2003). "Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)." Journal of Biological Chemistry **279**(7): 5405-5412.
- Dan, H. C., M. Sun, et al. (2004). "Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)." J Biol Chem **279**(7): 5405-5412.
- Datta, R., E. Oki, et al. (2000). "XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage." J Biol Chem **275**(41): 31733-31738.

- David, Y., T. Ziv, et al. (2010). "The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines." *J Biol Chem* **285**(12): 8595-8604.
- De Zio, D., E. Ferraro, et al. (2008). "Faf1 is expressed during neurodevelopment and is involved in Apaf1-dependent caspase-3 activation in proneural cells." *Cell Mol Life Sci* **65**(11): 1780-1790.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 378-390.
- Deshaies, R. J. and C. A. Joazeiro (2009). "RING domain E3 ubiquitin ligases." *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434.
- Deveraux, Q. L., E. Leo, et al. (1999). "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases." *EMBO J* **18**(19): 5242-5251.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, et al. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." *Nature* **388**(6639): 300-304.
- Dohi, T. (2004). "An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* **279**(33): 34087-34090.
- Doonan, F. and T. G. Cotter (2008). "Morphological assessment of apoptosis." *Methods* **44**(3): 200-204.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Ea, C. K., L. Deng, et al. (2006). "Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO." *Mol Cell* **22**(2): 245-257.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, et al. (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." *EMBO Rep* **7**(10): 988-994.
- Ekert, P. G., J. Silke, et al. (2001). "DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9." *J Cell Biol* **152**(3): 483-490.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Elnemr, A., T. Ohta, et al. (2001). "Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway." *Int J Oncol* **18**(2): 311-316.
- Eramo, A., M. Sargiacomo, et al. (2004). "CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells." *Eur J Immunol* **34**(7): 1930-1940.
- Ethell, D. W. and L. A. Buhler (2003). "Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain." *J Clin Immunol* **23**(6): 439-446.
- Fadell, B. and S. Orrenius (2005). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *J Intern Med* **258**(6): 479-517.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes." *Cell Death Differ* **5**(7): 551-562.
- Feng, G. and N. Kaplowitz (2002). "Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(5): G825-834.
- Ferreira, K. S., C. Kreutz, et al. (2012). "Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes." *Apoptosis* **17**(5): 503-515.

- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells." Infection and Immunity **73**(4): 1907-1916.
- Fischer, U., C. Stroh, et al. (2006). "Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10." Oncogene **25**(1): 152-159.
- Fong, W. G., P. Liston, et al. (2000). "Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines." Genomics **70**(1): 113-122.
- Frohlich, T., W. Risau, et al. (1998). "Characterization of novel nuclear targeting and apoptosis-inducing domains in FAS associated factor 1." J Cell Sci **111 (Pt 16)**: 2353-2363.
- Fu, J., Y. Jin, et al. (2003). "Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein." J Biol Chem **278**(52): 52660-52672.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-232.
- Galban, S. and C. S. Duckett (2010). "XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling." Cell Death Differ **17**(1): 54-60.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death Differ **14**(7): 1237-1243.
- Galluzzi, L., T. Vanden Berghe, et al. (2011). "Programmed necrosis from molecules to health and disease." Int Rev Cell Mol Biol **289**: 1-35.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.
- Garrison, J. B., R. G. Correa, et al. (2011). "ARTS and Siah collaborate in a pathway for XIAP degradation." Mol Cell **41**(1): 107-116.
- Gatti, R., S. Belletti, et al. (1998). "Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy." J Histochem Cytochem **46**(8): 895-900.
- Ginn, F. L., P. Hochstein, et al. (1969). "Membrane alterations in hemolysis: Internalization of plasmalemma induced by primaquine." Science **164**(3881): 843-845.
- Green, D. R., T. Ferguson, et al. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." Nat Rev Immunol **9**(5): 353-363.
- Guerra, B., B. Boldyreff, et al. (2001). "FAS-associated factor 1 interacts with protein kinase CK2 in vivo upon apoptosis induction." Int J Oncol **19**(6): 1117-1126.
- Gupta, S. (2002). "A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling." J Clin Immunol **22**(4): 185-194.
- Gyrd-Hansen, M., M. Darding, et al. (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." Nat Cell Biol **10**(11): 1309-1317.
- Gyrd-Hansen, M., M. Darding, et al. (2008). "IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis." Nature Cell Biology **10**(11): 1309-1317.
- Haas, T. L., C. H. Emmerich, et al. (2009). "Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction." Mol Cell **36**(5): 831-844.
- Habelhah, H. (2010). "Emerging complexity of protein ubiquitination in the NF-kappaB pathway." Genes Cancer **1**(7): 735-747.

- Hanson, Alison J., Heather A. Wallace, et al. (2012). "XIAP Monoubiquitylates Groucho/TLE to Promote Canonical Wnt Signaling." *Molecular Cell* **45**(5): 619-628.
- Hao, Z. and T. W. Mak (2010). "Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP." *J Mol Cell Biol* **2**(2): 63-64.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." *J Biol Chem* **277**(1): 432-438.
- Henkler, F., E. Behrle, et al. (2005). "The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability." *J Cell Biol* **168**(7): 1087-1098.
- Hidalgo, A., M. Baudis, et al. (2005). "Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma." *BMC Cancer* **5**: 77.
- Hinds, M. G., R. S. Norton, et al. (1999). "Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat." *Nat Struct Biol* **6**(7): 648-651.
- Hofer-Warbinek, R., J. A. Schmid, et al. (2000). "Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1." *J Biol Chem* **275**(29): 22064-22068.
- Holcik, M. and R. G. Korneluk (2001). "XIAP, the guardian angel." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(7): 550-556.
- Holcik, M., C. Lefebvre, et al. (1999). "A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection." *Nat Cell Biol* **1**(3): 190-192.
- Holcik, M. and N. Sonenberg (2005). "Translational control in stress and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 318-327.
- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* **1**(6): 489-495.
- Huang, X., Z. Wu, et al. (2013). "XIAP inhibits autophagy via XIAP-Mdm2-p53 signalling." *The EMBO Journal* **32**(16): 2204-2216.
- Hughes, M. A., N. Harper, et al. (2009). "Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival." *Mol Cell* **35**(3): 265-279.
- Iwabuchi, K., B. Li, et al. (1993). "Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization." *Oncogene* **8**(6): 1693-1696.
- Jang, M. S., J. W. Sul, et al. (2008). "Negative feedback regulation of Aurora-A via phosphorylation of Fas-associated factor-1." *J Biol Chem* **283**(47): 32344-32351.
- Jensen, H. H., M. Hjerrild, et al. (2001). "Phosphorylation of the Fas associated factor FAF1 by protein kinase CK2 and identification of serines 289 and 291 as the in vitro phosphorylation sites." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(6): 577-589.
- Jono, H., J. H. Lim, et al. (2004). "NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway." *J Biol Chem* **279**(35): 36171-36174.
- Jost, P. J., S. Grabow, et al. (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." *Nature* **460**(7258): 1035-1039.
- Kairisalo, M., L. Korhonen, et al. (2009). "NF-kappaB-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons by X-linked inhibitor of apoptosis protein." *Eur J Neurosci* **30**(6): 958-966.

- Kang, Y. J., M. Jang, et al. (2010). "Molecular interaction between HAX-1 and XIAP inhibits apoptosis." Biochemical and Biophysical Research Communications **393**(4): 794-799.
- Kashkar, H. (2010). "X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise." Clin Cancer Res **16**(18): 4496-4502.
- Kaufmann, T., A. Strasser, et al. (2012). "Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP." Cell Death Differ **19**(1): 42-50.
- Kaur, S., F. Wang, et al. (2005). "X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1)." J Biol Chem **280**(46): 38599-38608.
- Keane, R. W., A. R. Davis, et al. (2006). "Inflammatory and apoptotic signaling after spinal cord injury." J Neurotrauma **23**(3-4): 335-344.
- Keane, R. W., S. Kraydieh, et al. (2001). "Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **21**(10): 1189-1198.
- Kerr, J. F. (1971). "Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death." J Pathol **105**(1): 13-20.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, H., H. C. Tu, et al. (2009). "Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis." Mol Cell **36**(3): 487-499.
- Kim, H. J., E. J. Song, et al. (2005). "Human Fas-associated factor 1 interacts with heat shock protein 70 and negatively regulates chaperone activity." J Biol Chem **280**(9): 8125-8133.
- Kim, S., C. Kang, et al. (2006). "TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1." J Neurosci **26**(9): 2403-2412.
- Kinoshita, T., C. Kondoh, et al. (2006). "Fas-associated factor 1 is a negative regulator of PYRIN-containing Apaf-1-like protein 1." Int Immunol **18**(12): 1701-1706.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 937-953.
- Koseki, T., N. Inohara, et al. (1998). "ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5156-5160.
- Krappmann, D. and C. Scheidereit (2005). "A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways." EMBO Rep **6**(4): 321-326.
- Krieg, A., R. G. Correa, et al. (2009). "XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(34): 14524-14529.
- Kroemer, G., W. S. El-Deiry, et al. (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kung, G., K. Konstantinidis, et al. (2011). "Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart." Circ Res **108**(8): 1017-1036.
- Kurosaka, K., M. Takahashi, et al. (2003). "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages." J Immunol **171**(9): 4672-4679.

- Lang, F., M. Foller, et al. (2005). "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death." *J Membr Biol* **205**(3): 147-157.
- Laster, S. M., J. G. Wood, et al. (1988). "Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis." *J Immunol* **141**(8): 2629-2634.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 265-267.
- Lavrik, I. N. (2011). "[Regulation of death receptor-induced apoptosis induced via CD95/FAS and other death receptors]." *Mol Biol (Mosk)* **45**(1): 173-179.
- Lavrik, I. N. and P. H. Krammer (2011). "Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC." *Cell Death and Differentiation* **19**(1): 36-41.
- LeBlanc, A. C. (2003). "Natural cellular inhibitors of caspases." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**(2): 215-229.
- Lee, J. J., Y. M. Kim, et al. (2012). "Ubiquitin-associated (UBA) domain in human Fas associated factor 1 inhibits tumor formation by promoting Hsp70 degradation." *PLoS One* **7**(8): e40361.
- Lee, J. J., J. K. Park, et al. (2013). "Complex of Fas-associated factor 1 (FAF1) with valosin-containing protein (VCP)-Npl4-Ufd1 and polyubiquitinated proteins promotes endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)." *J Biol Chem* **288**(10): 6998-7011.
- Lee, K. H., C. Feig, et al. (2006). "The role of receptor internalization in CD95 signaling." *EMBO J* **25**(5): 1009-1023.
- Lehle, L., S. Strahl, et al. (2006). "Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases." *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(41): 6802-6818.
- Lev, N., E. Melamed, et al. (2003). "Apoptosis and Parkinson's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**(2): 245-250.
- Levin, S. (1998). "Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists." *Toxicol Sci* **41**(2): 155-156.
- Levine, B. (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" *Journal of Clinical Investigation* **115**(10): 2679-2688.
- Lewis, J., E. Burstein, et al. (2004). "Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis." *J Biol Chem* **279**(10): 9023-9029.
- Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation." *Cytokine* **41**(1): 1-8.
- Liao, W., Q. Xiao, et al. (2008). "CARP-2 is an endosome-associated ubiquitin ligase for RIP and regulates TNF-induced NF-kappaB activation." *Curr Biol* **18**(9): 641-649.
- Liston, P., W. G. Fong, et al. (2001). "Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity." *Nat Cell Biol* **3**(2): 128-133.
- Liston, P., N. Roy, et al. (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." *Nature* **379**(6563): 349-353.
- Liu, W. H., H. W. Hsiao, et al. (2007). "Notch inhibits apoptosis by direct interference with XIAP ubiquitination and degradation." *EMBO J* **26**(6): 1660-1669.
- Lizarbe Iracheta, M. A. (2007). "El suicidio y la muerte celular." *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* **101**(Nº2): pp.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.

- Lotocki, G., O. F. Alonso, et al. (2003). "Monoubiquitination and cellular distribution of XIAP in neurons after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **23**(10): 1129-1136.
- Lu, M., S. C. Lin, et al. (2007). "XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization." Mol Cell **26**(5): 689-702.
- MacFarlane, M., W. Merrison, et al. (2002). "Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro." J Biol Chem **277**(39): 36611-36616.
- Mackay, I. R., N. V. Leskovsek, et al. (2008). "Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal." J Autoimmun **30**(1-2): 5-11.
- Magrassi, L., K. Leto, et al. (2013). "Lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(11): 4374-4379.
- Maine, G. N., X. Mao, et al. (2007). "COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase." EMBO J **26**(2): 436-447.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.
- Majno, G., M. La Gattuta, et al. (1960). "Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver." Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med **333**: 421-465.
- Markson, G., C. Kiel, et al. (2009). "Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network." Genome Res **19**(10): 1905-1911.
- Martins, L. M., A. Morrison, et al. (2004). "Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice." Mol Cell Biol **24**(22): 9848-9862.
- Mehlen, P. and D. E. Bredesen (2011). "Dependence receptors: from basic research to drug development." Sci Signal **4**(157): mr2.
- Mei, Y., A. A. Hahn, et al. (2011). "The USP19 Deubiquitinase Regulates the Stability of c-IAP1 and c-IAP2." Journal of Biological Chemistry **286**(41): 35380-35387.
- Menges, C. W., D. A. Altomare, et al. (2009). "FAS-associated factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis." Cell Cycle **8**(16): 2528-2534.
- Milovic-Holm, K., E. Kriehoff, et al. (2007). "FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies." EMBO J **26**(2): 391-401.
- Mitsiades, N., W. H. Yu, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity." Cancer Res **61**(2): 577-581.
- Mollinedo, F. and C. Gajate (2006). FasL-independent activation of Fas. Fas signaling, Springer: 13-27.
- Morizane, Y. (2005). "X-Linked Inhibitor of Apoptosis Functions as Ubiquitin Ligase toward Mature Caspase-9 and Cytosolic Smac/DIABLO." Journal of Biochemistry **137**(2): 125-132.
- Morizane, Y., R. Honda, et al. (2005). "X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO." J Biochem **137**(2): 125-132.
- Mufti, A. R., E. Burstein, et al. (2007). "XIAP: Cell death regulation meets copper homeostasis." Archives of Biochemistry and Biophysics **463**(2): 168-174.
- Musatov, S., J. Goldfein, et al. (2005). "940. Neuroprotective Effects of XIAP Gene Therapy in Models of Neurodegenerative Diseases." Molecular Therapy **11**: 363-364.

- Nakamura, T., L. Wang, et al. (2010). "Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death." *Mol Cell* **39**(2): 184-195.
- Nam, Y. J., K. Mani, et al. (2004). "Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions." *Mol Cell* **15**(6): 901-912.
- Napetschnig, J. and H. Wu (2013). "Molecular basis of NF-kappaB signaling." *Annu Rev Biophys* **42**: 443-468.
- Naude, P. J., J. A. den Boer, et al. (2011). "Tumor necrosis factor receptor cross-talk." *FEBS J* **278**(6): 888-898.
- Nijhawan, D., N. Honarpour, et al. (2000). "Apoptosis in neural development and disease." *Annu Rev Neurosci* **23**: 73-87.
- O'Donnell, M. A. and A. T. Ting (2011). "RIP1 comes back to life as a cell death regulator in TNFR1 signaling." *FEBS J* **278**(6): 877-887.
- Oberst, A., C. Pop, et al. (2010). "Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation." *J Biol Chem* **285**(22): 16632-16642.
- Olsen, B. B., V. Jessen, et al. (2003). "Protein kinase CK2 phosphorylates the Fas-associated factor FAF1 in vivo and influences its transport into the nucleus." *FEBS Lett* **546**(2-3): 218-222.
- Pan, J., Y. X. Zhao, et al. (2007). "Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease." *Neurosci Lett* **428**(2-3): 82-87.
- Papoff, G., P. Hausler, et al. (1999). "Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor." *J Biol Chem* **274**(53): 38241-38250.
- Park, M. Y., H. D. Jang, et al. (2004). "Fas associated factor 1 inhibits NF-kB activity by interfering with nuclear translocation of RelA (p65) subunit of NF-kB." *J Biol Chem*.
- Park, M. Y., J. H. Moon, et al. (2007). "FAF1 suppresses IkappaB kinase (IKK) activation by disrupting the IKK complex assembly." *J Biol Chem* **282**(38): 27572-27577.
- Park, M. Y., S. W. Ryu, et al. (2005). "Fas-associated factor-1 mediates chemotherapeutic-induced apoptosis via death effector filament formation." *Int J Cancer* **115**(3): 412-418.
- Parrish, A. B., C. D. Freel, et al. (2013). "Cellular mechanisms controlling caspase activation and function." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(6).
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 49-62.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
- Phillipps, H. R. and P. R. Hurst (2012). "XIAP: a potential determinant of ovarian follicular fate." *Reproduction* **144**(2): 165-176.
- Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." *Microbiol Rev* **59**(1): 94-123.
- Polevoda, B. and F. Sherman (2003). "N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins." *J Mol Biol* **325**(4): 595-622.
- Profyris, C., S. S. Cheema, et al. (2004). "Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury." *Neurobiol Dis* **15**(3): 415-436.

- Rao, V. S., K. Srinivas, et al. (2014). "Protein-protein interaction detection: methods and analysis." *Int J Proteomics* **2014**: 147648.
- Raoul, C., A. G. Estevez, et al. (2002). "Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations." *Neuron* **35**(6): 1067-1083.
- Ravichandran, K. S. and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." *Nat Rev Immunol* **7**(12): 964-974.
- Reffey, S. B. (2001). "X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Functions as a Cofactor in Transforming Growth Factor-beta Signaling." *Journal of Biological Chemistry* **276**(28): 26542-26549.
- Reigada, D., M. Nieto-Diaz, et al. (2015). "Acute administration of ucf-101 ameliorates the locomotor impairments induced by a traumatic spinal cord injury." *Neuroscience* **300**: 404-417.
- Resch, U., Y. M. Schichl, et al. (2009). "Siva1 is a XIAP-interacting protein that balances NFkappaB and JNK signalling to promote apoptosis." *J Cell Sci* **122**(Pt 15): 2651-2661.
- Riedl, S. J., M. Renatus, et al. (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* **104**(5): 791-800.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-413.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." *Trends Mol Med* **12**(9): 440-450.
- Rowland, J. W., G. W. Hawryluk, et al. (2008). "Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon." *Neurosurg Focus* **25**(5): E2.
- Ryu, S. W., S. K. Chae, et al. (1999). "Identification and characterization of human Fas associated factor 1, hFAF1." *Biochem Biophys Res Commun* **262**(2): 388-394.
- Ryu, S. W. and E. Kim (2001). "Apoptosis induced by human Fas-associated factor 1, hFAF1, requires its ubiquitin homologous domain, but not the Fas-binding domain." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5): 1027-1032.
- Ryu, S. W., S. J. Lee, et al. (2003). "Fas associated factor 1, FAF1, is a member of Fas-death inducing signaling complex." *J Biol Chem* **17**: 17.
- Safa, A. R. (2012). "c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator." *Exp Oncol* **34**(3): 176-184.
- Saleem, M., M. I. Qadir, et al. (2013). "Inhibitors of Apoptotic Proteins: New Targets for Anticancer Therapy." *Chemical Biology & Drug Design* **82**(3): 243-251.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (2000). "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70." *Nat Cell Biol* **2**(8): 476-483.
- Sartore-Bianchi, A., R. Ricotta, et al. (2007). "Rationale and clinical results of multi-target treatments in oncology." *Int J Biol Markers* **22**(1 Suppl 4): S77-87.
- Sasaki, N., T. Morisaki, et al. (2001). "Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue." *Clin Cancer Res* **7**(12): 4136-4142.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* **17**(6): 1675-1687.
- Schile, A. J., M. Garcia-Fernandez, et al. (2008). "Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity." *Genes Dev* **22**(16): 2256-2266.
- Schimmer, A. D., S. Dalili, et al. (2006). "Targeting XIAP for the treatment of malignancy." *Cell Death Differ* **13**(2): 179-188.

- Schuberth, C. and A. Buchberger (2008). "UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97." Cell Mol Life Sci **65**(15): 2360-2371.
- Schulte, M., K. Reiss, et al. (2007). "ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death." Cell Death and Differentiation.
- Schutze, S., V. Tchikov, et al. (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 655-662.
- Seeger, J. M., K. Brinkmann, et al. (2010). "Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance." Br J Cancer **102**(12): 1717-1723.
- Shalit, I., P. A. McKee, et al. (1985). "Comparison of polyclonal antiserum versus monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infections by immunofluorescence in clinical specimens." J Clin Microbiol **22**(5): 877-879.
- Shawgo, M. E., S. N. Shelton, et al. (2009). "Caspase-9 activation by the apoptosome is not required for fas-mediated apoptosis in type II Jurkat cells." J Biol Chem **284**(48): 33447-33455.
- Shen, H. M. and Z. G. Liu (2006). "JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species." Free Radic Biol Med **40**(6): 928-939.
- Shi, Y. (2004). "Caspase activation: revisiting the induced proximity model." Cell **117**(7): 855-858.
- Shibata, T., T. Noguchi, et al. (2008). "Disturbed XIAP and XAF1 expression balance is an independent prognostic factor in gastric adenocarcinomas." Ann Surg Oncol **15**(12): 3579-3587.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, et al. (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." Mol Cell **11**(2): 519-527.
- Siegel, C., J. Li, et al. (2011). "miR-23a regulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) contributes to sex differences in the response to cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(28): 11662-11667.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." Science **288**(5475): 2354-2357.
- Song, E. J., S. H. Yim, et al. (2005). "Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway." Mol Cell Biol **25**(6): 2511-2524.
- Sprick, M. R., E. Rieser, et al. (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." EMBO J **21**(17): 4520-4530.
- Srinivasula, S. M., S. Gupta, et al. (2003). "Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2." J Biol Chem **278**(34): 31469-31472.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, et al. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.
- Sul, J. W., M. Y. Park, et al. (2013). "Accumulation of the parkin substrate, FAF1, plays a key role in the dopaminergic neurodegeneration." Hum Mol Genet **22**(8): 1558-1573.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al. (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3

- and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8662-8667.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.
- Thorburn, A. (2004). "Death receptor-induced cell killing." Cellular Signalling **16**(2): 139-144.
- Tong, Q. S., L. D. Zheng, et al. (2005). "Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells." Cancer Gene Ther **12**(5): 509-514.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Trump, B. F., I. K. Berezsky, et al. (1997). "The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis." Toxicol Pathol **25**(1): 82-88.
- Trump, B. F., P. J. Goldblatt, et al. (1965). "Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets." Lab Invest **14**(11): 2000-2028.
- Tsang, A. H., Y. I. Lee, et al. (2009). "S-nitrosylation of XIAP compromises neuronal survival in Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4900-4905.
- Van Themsche, C., V. Leblanc, et al. (2009). "X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Regulates PTEN Ubiquitination, Content, and Compartmentalization." Journal of Biological Chemistry **284**(31): 20462-20466.
- Vande Walle, L., M. Lamkanfi, et al. (2008). "The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview." Cell Death Differ **15**(3): 453-460.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-442.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell death in development." Cell **96**(2): 245-254.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2005). "IAPs, RINGs and ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 287-297.
- Vaux, D. L., I. L. Weissman, et al. (1992). "Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2." Science **258**(5090): 1955-1957.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Verhagen, A. M., T. K. Kratina, et al. (2006). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." Cell Death and Differentiation **14**(2): 348-357.
- Virchow, R. (1859). "Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology, ed 2. ." Translated from German by B Chance, 1859. Reproduced by Dover Publications in 1971: 356-382.
- Vischioni, B., P. van der Valk, et al. (2006). "Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues." Hum Pathol **37**(1): 78-86.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, et al. (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Wang, G., Y. Zhang, et al. (2003). "Preliminary studies on Alzheimer's disease using cDNA microarrays." Mech Ageing Dev **124**(1): 115-124.

- Watzlawik, J., A. E. Warrington, et al. (2010). "Importance of oligodendrocyte protection, BBB breakdown and inflammation for remyelination." Expert Rev Neurother **10**(3): 441-457.
- Weerasinghe, P. and L. M. Buja (2012). "Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death." Experimental and Molecular Pathology **93**(3): 302-308.
- Wei, Y., T. Fan, et al. (2008). "Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis." Acta Biochimica et Biophysica Sinica **40**(4): 278-288.
- Wilkinson, J. C., E. Cepero, et al. (2004). "Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **24**(16): 7003-7014.
- Wilkinson, J. C., A. S. Wilkinson, et al. (2007). "Apoptosis-Inducing Factor Is a Target for Ubiquitination through Interaction with XIAP." Molecular and Cellular Biology **28**(1): 237-247.
- Winsauer, G., U. Resch, et al. (2008). "XIAP regulates bi-phasic NF-kappaB induction involving physical interaction and ubiquitination of MEKK2." Cell Signal **20**(11): 2107-2112.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res **30**: 87.
- Wu, C. J., D. B. Conze, et al. (2006). "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." Nat Cell Biol **8**(4): 398-406.
- Wu, M., Y. Sun, et al. (2007). "Immunohistochemical detection of XIAP in mesothelium and mesothelial lesions." Am J Clin Pathol **128**(5): 783-787.
- Wu, W., P. Liu, et al. (2012). "Necroptosis: an emerging form of programmed cell death." Crit Rev Oncol Hematol **82**(3): 249-258.
- Xie, Y., L. A. Tobin, et al. (2013). "MicroRNA-24 regulates XIAP to reduce the apoptosis threshold in cancer cells." Oncogene **32**(19): 2442-2451.
- Yamaguchi, K., S. Nagai, et al. (1999). "XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway." EMBO J **18**(1): 179-187.
- Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." Cell **80**(2): 285-291.
- Yang, X., H. Xing, et al. (2005). "Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells." Gynecol Oncol **97**(2): 413-421.
- Yang, Y. and X. Yu (2003). "Regulation of apoptosis: the ubiquitous way." FASEB J **17**(8): 790-799.
- Yeh, P. Y., S. E. Chuang, et al. (2003). "Involvement of nuclear transcription factor-kappa B in low-dose doxorubicin-induced drug resistance of cervical carcinoma cells." Biochem Pharmacol **66**(1): 25-33.
- Yoshino, O., H. Matsuno, et al. (2004). "The role of Fas-mediated apoptosis after traumatic spinal cord injury." Spine (Phila Pa 1976) **29**(13): 1394-1404.
- Young, J. C., V. R. Agashe, et al. (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 781-791.
- Yousefi, S., J. A. Gold, et al. (2008). "Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense." Nat Med **14**(9): 949-953.
- Yuan, R. T., S. Young, et al. (2012). "Caspase-8 isoform 6 promotes death effector filament formation independent of microtubules." Apoptosis **17**(3): 229-235.
- Yuan, S., X. Yu, et al. (2011). "The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3." Structure **19**(8): 1084-1096.

- Zhang, L., K. Blackwell, et al. (2010). "The RING domain of TRAF2 plays an essential role in the inhibition of TNF α -induced cell death but not in the activation of NF- κ B." *J Mol Biol* **396**(3): 528-539.
- Zhang, L., F. Zhou, et al. (2012). "Fas-associated Factor 1 Is a Scaffold Protein That Promotes beta-Transducin Repeat-containing Protein (beta-TrCP)-mediated beta-Catenin Ubiquitination and Degradation." *J Biol Chem* **287**(36): 30701-30710.
- Zhang, L., F. Zhou, et al. (2011). "Fas-associated factor 1 antagonizes Wnt signaling by promoting beta-catenin degradation." *Mol Biol Cell* **22**(9): 1617-1624.
- Zheng, C., V. Kabaleeswaran, et al. (2010). "Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation." *Mol Cell* **38**(1): 101-113.
- Zinchuk, V., O. Zinchuk, et al. (2007). "Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena." *Acta Histochem Cytochem* **40**(4): 101-111.
- Zou, H., Y. Li, et al. (1999). "An APAF-1:cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *J Biol Chem* **274**(17): 11549-11556.
- Zou, H., R. Yang, et al. (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." *J Biol Chem* **278**(10): 8091-8098.