

**ESTUDI DE LA FUNCIO DE LES PROTEINES RCAN EN  
L'ACTIVACIO LIMFOCITARIA: APLICACIO EN LA CERCA DE  
NOUS FARMACS IMMUNOSUPRESSORS**

M<sup>a</sup> Carme Mulero Roig

Tesi Doctoral

Barcelona 2008



**Memòria de Tesi realitzada a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge  
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona**

**PROGRAMA DE DOCTORAT EN IMMUNOLOGIA**

**BIENNI 2002-2004**

**DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA**

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**Presentada per:**

**M<sup>a</sup> CARME MULERO ROIG**

**Directora de la Tesi:**

**Tutor de la Tesi:**

**Dra. Mercè Pérez Riba**

**Dr. Antonio Celada Cotarelo**

**Departament de Genètica Molecular Humana**

**Departament de Fisiologia**

**IDIBELL**

**Universitat de Barcelona**

**La doctoranda:**

**M<sup>a</sup>Carme Mulero Roig**



*Als meus pares*



## **AGRAÏMENTS**





En cinc anys, la veritat és que et dona temps de coincidir amb molta gent. En el meu cas, haig de dir que he rebut ajuda de nombroses persones a tots nivells, tant del departament de Genètica, com del COM durant l'exili del grup, i sempre en general, i del CIPF durant la meua estada per terres valencianes. Per tothom en bloc va el meu agraïment, així que encara que no us hi trobeu en aquestes pàgines no significa que me n'hagi oblidat de vosaltres, però ja sabeu que l'espai i la locuacitat són limitats. En particular, voldria fer esment d'algunes persones amb qui el tracte durant aquest temps ha estat més estret per algun motiu o altre.

En primer lloc, voldria agrair-li al Dr. Pep Nomdedéu el fet d'haver-me introduït en el meravellós món de la recerca i ser el responsable de donar-me l'empenta en el moment oportú. Aquell gest em va portar a l'IRO i a entrar al Grup de Senyalització Cel·lular dirigit per la Dra. Mercè Pérez Riba. A tu, Mercè, voldria agrair-te haver confiat des de l'inici en mi i haver volgut compartir, i fer-ho, gran part dels teus coneixements de la ciència. Sempre t'hi estaré agraïda. La teva proximitat, capacitat de diàleg i implicació en tot moment ha facilitat força les coses, sobretot en aquest *sprint* final. Així que gràcies per tot i ja saps on sóc. A l'Anna, gràcies per acollir-me en el grup i per compartir el que saps de proteïnes amb mi, que és molt. A tothom qui ha format part en un moment o altre del grup, en especial a la Meri pel seu entusiasme i sobretot a la Nerea amb qui vaig compartir jornades maratonianes de fer maxis *non stop*, entre d'altres moments gloriosos. No veas como curramos pero que bien que nos lo pasamos, oye, con ayuda de la toledana y su afición por caerse en las papeleras, claro. Òbviament, també agrair a les noves incorporacions, Eva i Sergio, que han patit a les seves carns l'estrès final que suposa acabar una Tesi. A l'Eva Pros gràcies per estar sempre disposada a ajudar-me, encara que això t'endarrerís a tu la feina, i sobretot per ser amigueta meua. Al Xavier per ser tant igual a mi, em pensava que era l'única al món però veig que com a mínim en som dos. I a tothom de GM, passat i present, EvaLT, Magüi-Antoni, JuanJose, Sandra, Raquel, el i la Mari Carmen.....que si hagués de nomenar-los a tots em sortiria un apartat tant llarg que quan acabéssiu de llegir-lo ja no us quedarien ganes de continuar amb el que encara us queda. Tot i que la menció especial del jurat se l'emporta la Begoña Hurtado Villarejo bàsicament per ser com és, per acceptar-me com sóc, i tot això, encara voler compartir amb mi estones tant a dins com a fora d'aquestes quatre parets, perquè encara que no ho sembli, hi ha vida a fora, sí, hi ha vida.

Del COM no voldria oblidar-me de la Júlia per ajudar-me totes les vegades que ho he necessitat, que han estat moltes, tant des del punt de vista fungible com del no tangible, coneixements, recomanacions et al. Et vaig dir que t'hi posaria, i aquí estàs. I a la Violeta, Eder i tota la resta d'aquell laboratori pel temps compartit.

També voldria agrair al Dr. Àngel Messeguer i al Dr. Joaquim Messeguer del CSIC pels coneixements i hores de feina que els ha suposat poder tirar endavant la cerca de molècules, i al Dr. Enrique Pérez Payá per facilitar-me l'estada al seu grup i la realització dels experiments. De la gent del CIPF, agrair al grup del Quique en bloc i també a les proteòmiques la paciència tinguda en tot moment amb mi i el temps que la meua ignorància

els ha pogut robar. En aquest cas, la menció especial del jurat se l'emporta la Dra. Mar Orzáez per acollir-me i esforçar-se en integrar-me des del primer moment al grup. Además, gracias por introducirme en el misterioso mundo, al menos para mi hasta entonces, de los péptidos, compartir conmigo todo lo que tienes en esa cabecita y de rebote presentarme a Victor. Yo intenté tratarlo lo mejor que pude, pero él no se portó demasiado bien con nosotras. A veces, los aparatos son así. Además, también darte las gracias por animarme tooodas las veces que montaba placas y no salía ni un positivo, que fueron (casi) todas ja,ja, y por todavía quedarte ganas de sacarme por ahí alguna vez para intentar socializarnos un poco.

Per l'últim m'he deixat a la part més important de totes, els amics i la família.

Als amics gràcies per entendre el tipus de feina a la que m'hi dedico i pel temps que això suposa que els robi de poder compartir. En especial, a la Susana i a la Marta, que són les que ho han viscut en primera persona.

A la família també gràcies per intentar entendre que mai tindrè un treball de persona normal. A la Enri i al Dani, perquè haig de reconèixer que definitivament lo meu no és la informàtica. I en especial, als meus pares que mai han qüestionat cap ni una de les decisions laborals que he pres, algunes d'elles aparentment incongruents, i que sempre han estat i estic segura que estaran, al meu costat. A ells va dedicada aquesta Tesi.

## ÍNDEX



|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | LA TERAPIA IMMUNOSUPRESSORA AL TRASPLANTAMENT  | 1  |
| 2.     | LA CALCINEURINA  | 2  |
| 3.     | ESTRUCTURA DE LA CALCINEURINA  | 2  |
| 4.     | REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA DE LA CALCINEURINA  | 4  |
| 4.1.   | Regulació dependent de $Ca^{2+}$ i CaM   | 4  |
| 4.2.   | Regulació dependent de l'estat oxidatiu  | 4  |
| 4.3.   | Altres mecanismes de regulació   | 4  |
| 5.     | SUBSTRATS DE LA CALCINEURINA   | 5  |
| 6.     | LA FAMÍLIA DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ NFAT   | 6  |
| 6.1.   | Estructura dels factors de transcripció NFAT   | 6  |
| 6.2.   | Regulació de la translocació dels factors de transcripció NFAT                               | 8  |
| 6.3.   | Regulació transcripcional dependent dels factors de transcripció NFAT                        | 8  |
| 6.3.1. | Homodímers de NFAT   | 9  |
| 6.3.2. | Cooperació NFAT:AP1  | 9  |
| 6.3.3. | Cooperació NFAT:GATA   | 10 |
| 6.3.4. | Cooperació NFAT:MEF2   | 10 |
| 6.3.5. | Cooperació amb altres factors de transcripció  | 10 |
| 7.     | EFFECTES FUNCIONALS DE LA CALCINEURINA   | 11 |
| 7.1.   | Funció de la Cn a cervell  | 11 |
| 7.2.   | Funció de la Cn a cor  | 12 |
| 7.3.   | Funció de la Cn a múscul esquelètic  | 12 |
| 7.4.   | Funció de la Cn al sistema immunitari  | 13 |
| 7.5.   | Funció de la Cn en altres teixits  | 13 |
| 8.     | FUNCIO DE LA CALCINEURINA AL SISTEMA IMMUNITARI  | 13 |
| 8.1.   | Activació limfocitària de cèl·lules T  | 14 |
| 8.1.1. | Efecte de l'InsP <sub>3</sub> en l'activació de la família dels factors de transcripció NFAT | 15 |
| 8.1.2. | Efecte del DAG en l'activació de la família dels factors de transcripció AP1 i NF $\kappa$ B | 16 |
| 8.2.   | Importància de la via $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT en l'activació limfocitària                         | 17 |
| 9.     | INHIBIDORS DE LA CALCINEURINA  | 18 |
| 9.1.   | Inhibidors exògens clàssics: els fàrmacs CsA i FK506   | 18 |
| 9.2.   | Inhibidors endògens i cel·lulars   | 21 |
| 9.2.1. | AKAP79   | 22 |
| 9.2.2. | Cabin1/Cain  | 23 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 9.2.3.    | A238L  | 24 |
| 9.2.4.    | CHP  | 25 |
| 9.2.5.    | CALSARCINA-1   | 26 |
| 9.2.6.    | FKBP38   | 26 |
| 9.2.7.    | CARABIN  | 27 |
| 9.2.8.    | Proteïnes RCAN   | 27 |
| 9.3.      | Pèptids inhibidors   | 28 |
| 9.3.1.    | SPRIEIT i VIVIT  | 28 |
| 9.3.2.    | LxVP   | 30 |
| 9.3.3.    | Pèptids de Cn: el domini AID i la regió <i>linker</i> de Cn        | 31 |
| 9.4.      | Molècules inhibidores  | 32 |
| 10.       | LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES RCAN                                       | 33 |
| 10.1.     | Regulador de la calcineurina 1, RCAN1                              | 33 |
| 10.1.1.   | Estructura gènica i patró d'expressió de <i>RCAN1</i>              | 33 |
| 10.1.2.   | Estructura i funció de la proteïna RCAN1                           | 35 |
| 10.1.2.1. | Implicacions funcionals de la interacció RCAN1-Cn                  | 37 |
| 10.1.2.2. | Altres proteïnes que interaccionen amb RCAN1                       | 40 |
| 10.2.     | Regulador de la calcineurina 2, RCAN2                              | 40 |
| 10.2.1.   | Estructura gènica i patró d'expressió de <i>RCAN2</i>              | 40 |
| 10.2.2.   | Estructura i funció de la proteïna RCAN2                           | 42 |
| 10.3.     | Regulador de la calcineurina 3, RCAN3                              | 43 |
| 10.3.1.   | Estructura gènica i patró d'expressió de <i>RCAN3</i>              | 43 |
| 10.3.2.   | Estructura i funció de la proteïna RCAN3                           | 44 |
| 11.       | ESTRATÈGIES PER BUSCAR DISRUPTORS D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA | 45 |
| 11.1.     | La química combinatòria: les quimioteques                          | 45 |
| 11.2.     | Metodologia de cribratge: anisotropia de fluorescència             | 47 |
| 11.3.     | Consideracions de l'ús de quimioteques combinatòries               | 49 |

---

**OBJECTIUS** 51

---

**MATERIALS I MÈTODES** 55

|   |    |
|---|----|
| <i>CAPÍTOL I: MANIPULACIÓ DE BACTERIS</i> | 57 |
| MATERIALS                                 | 57 |
| 1. SOQUES BACTERIANES                     | 57 |
| 2. PLASMIDIS                              | 57 |
| 3. GENS ANALITZATS                        | 58 |
| 4. ENCEBADORS                             | 59 |
| MÈTODES                                   | 60 |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 5.   | CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS   | 60 |
| 5.1.   | Amplificació de l'insert mitjançant PCR i preparació pel seu clonatge  | 60 |
| 5.2.   | Obtenció de l'insert per digestió amb enzims de restricció   | 62 |
| 5.3.   | Digestió i desfosforilació del vector  | 62 |
| 5.4.   | Lligació   | 63 |
| 6.   | PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS   | 63 |
| 6.1.   | <i>E. coli</i> XL1-Blue electrocompetents  | 63 |
| 6.2.   | <i>E. coli</i> XL1-Blue competents per xoc tèrmic  | 64 |
| 6.3.   | <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS competents per xoc tèrmic   | 64 |
| 7.   | TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS  | 64 |
| 7.1.   | Transformació de cèl·lules <i>E. coli</i> XL1-Blue per electroporació  | 65 |
| 7.2.   | Transformació de cèl·lules <i>E. coli</i> XL1-Blue per xoc tèrmic  | 65 |
| 7.3.   | Transformació de cèl·lules <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS per xoc tèrmic                                       | 65 |
| 8.   | VERIFICACIÓ DEL cDNA CLONAT  | 66 |
| 8.1.   | PCR de cribratge de les colònies obtingudes i purificació del DNA  | 66 |
| 8.2.   | Digestió de les colònies positives   | 67 |
| 8.3.   | PCR de seqüenciació del DNA  | 67 |
| 8.4.   | Purificació del DNA a gran escala  | 68 |
| 9.   | EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ A GLUTATIÓ-S-TRANSFERASA (GST)   | 68 |
| 9.1.   | Expressió i purificació de la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(2-144) i digestió amb la proteasa Factor Xa        | 69 |
| 9.2.   | Expressió i purificació de diverses proteïnes de fusió GST-CnA $\alpha$ i digestió amb la proteasa PreScission | 70 |
| 9.3.   | SDS-PAGE (electroforesi en gel de poliàcrilamida) i tinció del gel amb Coomassie Blue                          | 71 |
| <b>CAPÍTOL II: MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES</b> |  | 72 |
| <b>MATERIALS</b>                                       |  | 72 |
| 10.  | LÍNIES CEL·LULARS  | 72 |
| 11.  | MEDIS DE CULTIU  | 72 |
| <b>MÈTODES</b>   |  | 72 |
| 12.  | RT-PCR SEMIQUANTITATIVA DEL RNA TOTAL  | 72 |
| 12.1.  | Determinació dels nivells de mRNA dels transcrits de <i>RCAN1</i> i <i>RCAN3</i>                               | 72 |
| 12.2.  | Determinació dels nivells de mRNA de diverses citoquines dependents de NFAT en presència del producte IDI3A    | 73 |
| 12.3.  | Extracció del RNA total i retro-transcripció (RT) del RNA  | 73 |
| 12.4.  | PCR dels gens d'interés  | 74 |
| 13.  | TRANSFECCIÓ DE DNA PLASMÍDIC EN CÈL·LULES EUCARIOTES   | 75 |
| 13.1.  | Transfecció del DNA plasmídic per electroporació   | 75 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 13.2.   | Transfecció del DNA plasmídic amb DEAE-dextran  | 77 |
| 13.3.   | Transfecció del DNA plasmídic amb fosfat càlcic   | 77 |
| 14.   | CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES  | 78 |
| 14.1.   | Protocol de co-IP RCAN1-1-CnA   | 78 |
| 14.2.   | Protocol de co-IP RCAN3-2-CnA   | 79 |
| 15.   | PULL DOWN   | 80 |
| 16.   | TRANSFERÈNCIA DE WESTERN I ANÀLISI AMB ANTICOSSOS ESPECÍFICS  | 81 |
| 17.   | ASSAIGS DEL NIVELL DE TRANSLOCACIÓ DELS NFAT  | 82 |
| 17.1.   | Determinació de la capacitat inhibidora de RCAN1-1 i RCAN3-2 de la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina | 83 |
| 17.2.   | Determinació de la capacitat inhibidora del producte IDI3A de la translocació nuclear dels NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina | 83 |
| 18.   | ANÀLISI DE PROMOTORS AMB EL GEN MARCADOR DE LA LUCIFERASA   | 84 |
| 19.   | DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'EXPRESSIONI DE DIVERSOS GENS PER PCR A TEMPS REAL   | 85 |
| 20.   | PRODUCCIÓ D'UN ANTICÓS POLICLONAL ANTI-RCAN3-2 EN ASCITES DE RATOLÍ   | 87 |
| <i>CAPITOL III: ASSAIGS IN VITRO AMB PÈPTIDS I QUIMIOTEQUES COMBINATÒRIES</i> |   | 89 |
| MATERIALS   |   | 89 |
| 21.   | PÈPTIDS I QUIMIOTEQUES COMBINATÒRIES  | 89 |
| MÈTODES   |   | 91 |
| 22.   | ANÀLISI DELS PÈPTIDS PER DICROÏSME CIRCULAR   | 91 |
| 23.   | ASSAIGS D'ANISOTROPIA DE FLUORESCÈNCIA  | 91 |
| 23.1.   | Posada a punt de les interaccions pèptids-CnA $\alpha$ i determinació per anisotropia de fluorescència                                  | 92 |
| 23.2.   | Anàlisi de les dades obtingudes: càlculs de les $K_d$ i $IC_{50}$   | 94 |
| 24.   | ENTRECREUAMENT DE PÈPTIDS AMB FORMALDEHID   | 96 |
| 25.   | ASSAIGS DE FOSFORILACIÓ DE PÈPTIDS <i>IN VITRO</i> AMB LA PROTEÏNA QUINASA A DEPENDENT D'AMP <sub>c</sub> (PKA)                         | 96 |
| <i>CAPÍTOL IV: REACTIUS D'US GENERAL</i>                                      |   | 98 |
| A.  | SOLUCIONS GENERALS EMPRADES EN LA MANIPULACIÓ DE BACTERIS   | 98 |
| B.  | SOLUCIONS GENERALS EMPRADES EN LA MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES   | 99 |



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 1.         | CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ RCAN1-CALCINEURINA A LIMFÒCITS T HUMANS  | 107 |
| Article 1: | Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells | 111 |
| Annex I:   | Regulació de l'expressió gènica de <i>RCAN1</i> en línies cel·lulars de limfòcits T humans  | 113 |
| 2.         | CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ RCAN3-CALCINEURINA A LIMFÒCITS T HUMANS  | 115 |
| Article 2: | RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression  | 119 |
| Annex II:  | Caracterització d'un anticòs policlonal anti-RCAN3-2 generat en ratolí  | 121 |
| Annex III: | Determinació <i>in vivo</i> de la interacció RCAN3-2-Cn   | 125 |
| Annex IV:  | Motius de les RCAN caracteritzats fins al moment  | 126 |
| 3.         | AVALUACIÓ DEL PÈPTID C18 DE LES RCAN COM A EINA PER LA CERCA DE NOVES MOLÈCULES AMB POTENCIAL IMMUNOSUPRESSOR   | 127 |
| 3.1.       | Identificació i caracterització dels pèptids C18 de les RCAN  | 129 |
| 3.1.1.     | Anàlisi del plegament <i>in vitro</i> dels pèptids C18 de les RCAN per difracció circular   | 129 |
| 3.1.2.     | Fosforilació <i>in vitro</i> dels pèptids C18 de les RCAN   | 131 |
| 3.2.       | Anàlisi de la interacció C18-RCAN-CnA $\alpha$ mitjançant anisotropia de fluorescència  | 132 |
| 3.3.       | Caracterització de la interacció <i>in vitro</i> dels pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 amb CnA   | 134 |
| 3.3.1.     | Afinitat dels pèptids C18 de les RCANs per CnA  | 134 |
| 3.3.2.     | Especificitat de la interacció dels pèptids C18 de les RCAN per CnA   | 135 |
| 3.3.3.     | Competició creuada dels pèptids C18 de les RCAN respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA   | 136 |
| 3.3.4.     | Competició dels pèptids SPRIEIT i LxVP dels NFAT, que s'uneixen a Cn, respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA                         | 137 |
| 3.3.5.     | Competició del pèptid RII i dels complexos fàrmac-immunofilina respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA                                | 139 |
| 3.4.       | Interacció del pèptid PKIIQT de RCAN1 amb Cn  | 142 |
| 3.5.       | Cerca de molècules amb potencial immunosupressor mitjançant cribratge de quimiotèques respecte la interacció C18-RCAN1-CnA                            | 144 |
| 3.5.1.     | Cribratge de quimiotèques de mescles controlades de peptoides   | 145 |
| 3.5.2.     | Cribratge d'una quimioteca de mescles controlades d'hexapèptids de D-aminoàcids   | 146 |

|                  |  |            |
|------------------|--|------------|
| 3.5.3.           | Cribratge de quimiotèques de composts sols   | 147        |
| 3.5.4.           | Competició <i>in vitro</i> del producte IDI3A respecte altres interaccions amb potencial immunosupressor                     | 149        |
| 3.5.5.           | Caracterització de l'efecte funcional del producte IDI3A   | 149        |
| 3.5.5.1.         | Avaluació de la capacitat del producte IDI3A de competir la interacció RCAN-CnA mitjançant assaigs de tipus <i>pull down</i> | 150        |
| 3.5.5.2.         | Estudi de la capacitat d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina                | 151        |
| 3.5.5.3.         | Anàlisi del nivell d'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT en presència del producte IDI3A              | 152        |
| 3.6.             | Caracterització de la interacció <i>in vitro</i> de CnA amb el pèptid VIVIT de NFAT  | 153        |
| 3.7.             | Cerca de molècules amb potencial immunosupressor mitjançant cribratge de quimiotèques respecte la interacció VIVIT-CnA       | 155        |
| 3.7.1.           | Cribratge de quimiotèques de mesclades controlades en format de rastreig posicional  | 155        |
| 3.7.2.           | Cribratge d'una col·lecció de composts sols  | 157        |
| <u>DISCUSSIÓ</u> |  | <u>159</u> |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 1.       | EXPRESSIÓ GÈNICA DIFERENCIAL DE RCAN1 I RCAN3   | 161 |
| 1.1.     | <i>RCAN1</i>  | 161 |
| 1.2.     | <i>RCAN3</i>  | 162 |
| 2.       | EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES RCAN   | 163 |
| 3.       | INTERACCION DE LES PROTEÏNES RCAN AMB Cn  | 164 |
| 4.       | MOTIUS DE LES RCAN QUE PARTICIPEN EN LA INTERACCIÓ AMB Cn   | 164 |
| 4.1.     | El motiu FLISPP de les RCAN   | 164 |
| 4.2.     | Motius de les RCAN d'unió a Cn: el motiu ELHA i el motiu consens PxlxxT                                     | 165 |
| 4.2.1.   | El motiu ELHA   | 167 |
| 4.2.2.   | El motiu C18  | 167 |
| 4.2.2.1. | Els pèptids C18 de les RCAN adopten una conformació <i>random coil</i>                                      | 168 |
| 4.2.2.2. | Els pèptids C18 de les RCAN interaccionen amb la CnA $\alpha$ (2-347)mutada                                 | 168 |
| 4.2.2.3. | Les interaccions C18-RCAN1-Cn i C18-RCAN3-Cn <i>in vivo</i> poden requerir modificacions post-traduccionals | 171 |
| 4.2.2.4. | Els pèptids C18 de les RCAN són notablement afins per Cn  | 171 |
| 4.2.3.   | El motiu consens PxlxxT de les RCAN   | 173 |
| 4.2.3.1. | El pèptid PKIIQT no interacciona amb la CnA $\alpha$ (2-347)mutada <i>in vitro</i>                          | 174 |
| 4.2.3.2. | La fosforilació del motiu PKIIQT no és indispensable per interaccionar amb Cn                               | 176 |
| 5.       | LES RCAN INHIBEIXEN L'ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA  | 176 |
| 5.1.     | El pèptid C18 de les RCAN podria ser un inhibidor no competitiu de Cn                                       | 176 |
| 5.2.     | Efecte immunosupressor del motiu CIC de les RCAN a limfòcits T humans                                       | 177 |

|                     |   |            |
|---------------------|---|------------|
| 5.3.                | Patró diferencial de les RCAN en la inhibició de la transcripció dels gens de citoquines dependents de NFAT | 179        |
| 5.4.                | Paper dual de les RCAN <i>in vivo</i>   | 180        |
| 5.5.                | L'efecte inhibitor de les RCAN és més específic que el de CsA i FK506                                       | 181        |
| 5.6.                | Els pèptids C18 de les RCAN podrien ser una nova eina immunosupressora <i>in vivo</i>                       | 182        |
| 6.                  | CONSERVACIÓ A L'ESCALA EVOLUTIVA DELS MOTIUS DE LES RCAN<br>CARACTERITZATS FINS AL MOMENT                   | 182        |
| 7.                  | CERCA DE MOLÈCULES DISRUPTORES DE LA INTERACCIÓ C18-RCAN1-Cn  | 183        |
| 7.1.                | Les quimiotèques de peptoides no han identificat cap hit candidat   | 183        |
| 7.2.                | Quimioteca d'hexapèptids de D-aminoàcids  | 184        |
| 7.2.1.              | Els residus TPxV de RCAN1 podrien participar en la interacció amb Cn  | 184        |
| 7.3.                | Quimiotèques de composts sols   | 186        |
| 7.3.1.              | El producte IDI3A   | 187        |
| 8.                  | CERCA DE DISRUPTORS MITJANÇANT ANISOTROPIA DE FLUORESCÈNCIA   | 188        |
| 9.                  | ALTRES CONSIDERACIONS EN LA CERCA DE MOLÈCULES AMB POTENCIAL<br>IMMUNOSUPRESSOR                             | 189        |
| <u>CONCLUSIONS</u>  |   | <u>193</u> |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> |   | <u>197</u> |



## ABREVIATURES I SÍMBOLS



|                  |  |
|------------------|--|
| A                | Amper  |
| Å                | Ångstrom (0.1 nm)  |
| A238L            | <i>IκB-like protein (African swine fever virus)</i>                              |
| AKAP79           | de l'anglès, <i>A kinase anchor protein 79</i> (AKAP5, segons nomenclatura HUGO) |
| AP1              | de l'anglès, <i>activator protein 1</i>  |
| BSA              | albúmina sèrica bovina   |
| °C               | graus centígrads   |
| Ca <sup>2+</sup> | calci  |
| Cabin1           | de l'anglès, <i>calcineurin binding protein 1</i>                                |
| CALP             | calcipressina  |
| CaM              | calmodulina  |
| cDNA             | àcid desoxiribonuclèic complementari   |
| CF               | carboxifluoresceïna  |
| CHP              | de l'anglès, <i>calcineurin B homologous protein</i>                             |
| CnA              | subunitat catalítica de la calcineurina  |
| CnB              | subunitat reguladora de la calcineurina  |
| CsA              | ciclosporina A   |
| CSF2             | de l'anglès, <i>colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>         |
| CyPA             | ciclofilina A (PPIA, segons nomenclatura HUGO)                                   |
| dATP, dCTP       | desoxiadenosina trifosfat, desoxicitosina trifosfat                              |
| dGTP, dTTP       | desoxiguanidina trifosfat, desoxitimidina trifosfat                              |
| DMSO             | dimetilsulfòxid  |
| DNA              | àcid desoxiribonuclèic   |
| dNTP             | desoxinucleòtid trifosfat  |
| DSCR1            | de l'anglès, <i>Down syndrome candidate region 1</i>                             |
| DSCR1L1          | de l'anglès, <i>Down syndrome candidate region 1 like 1</i>                      |
| DSCR1L2          | de l'anglès, <i>Down syndrome candidate region 1 like 2</i>                      |
| DTT              | ditiotreitòl   |
| EGFP             | de l'anglès, <i>enhanced green fluorescent protein</i>                           |
| EYFP             | de l'anglès, <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>                          |
| F, μF            | Faraday, microFaraday  |
| FKBP12           | de l'anglès, <i>FK506 binding protein 1A, 12 kDa</i>                             |
| FKBP38           | de l'anglès, <i>FK506 binding protein 8, 38 kDa</i>                              |
| g, mg, ng, μg    | gram, mil·ligram, nanogram, microgram  |
| g                | velocitat de centrifugació mesurada en unitats de gravetat                       |
| GAPDH            | gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa  |
| GATA 2/3/4       | factor de transcripció GATA 2, 3 i 4   |
| GST              | de l'anglès, <i>Glutathione S-transferase</i>                                    |
| h                | hora   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HA                | de l'anglès, <i>hemagglutinin</i>   |
| IC <sub>50</sub>  | concentració a la qual una molècula competeix un 50% una determinada interacció                               |
| INCA              | de l'anglès, <i>inhibitor of NFAT-calcineurin interaction</i>   |
| INFG              | interferó gamma   |
| IL2/3/4/5/6/10/13 | interleuquina 2, 3, 4, 5, 6, 10 i 13  |
| Kb, pb            | kilobase, parells de bases  |
| K <sub>d</sub>    | concentració a la qual el 50% d'una determinada molècula està unida a la seva diana i l'altre 50% està lliure |
| kDa, Da           | kilodalton, dalton  |
| l, ml, µl         | litres, mil·lilitres, microlitres   |
| LTA               | de l'anglès, <i>lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>   |
| LTB               | de l'anglès, <i>lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)</i>  |
| M, mM, µM, nM     | molar, mil·limolar, micromolar, nanomolar   |
| MALDI-TOF         | de l'anglès, <i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>                                |
| MCIP              | de l'anglès, <i>modulatory calcineurin-interacting protein</i>  |
| MEF2              | de l'anglès, <i>myocyte enhancer factor 2</i>   |
| min               | minut   |
| mRNA              | àcid ribonuclèic missatger  |
| NFATc1-c4         | de l'anglès, <i>nuclear factor of activated T cells</i> (del c1 al c4)  |
| Ω                 | Ohm   |
| p/v               | pes/volum   |
| PCR               | de l'anglès, <i>polymerase chain reaction</i>   |
| PKA               | de l'anglès, <i>cAMP-dependent protein kinase</i>   |
| pmol              | picomol   |
| RII               | pèptid provinent de subunitat reguladora, tipus II, alfa de la PKA  |
| RCAN              | de l'anglès, <i>regulator of calcineurin</i>  |
| RMN               | ressonància magnètica nuclear   |
| RT                | transcripció reversa  |
| RT-PCR            | reacció de PCR a partir de cDNA generat mitjançant transcripció reversa                                       |
| s                 | segon   |
| SD                | Síndrome de Down  |
| TCR               | receptor de cèl·lules T   |
| TGFB1             | de l'anglès, <i>transforming growth factor, beta 1</i>  |
| Th1 i Th2         | subpoblacions de limfòcits T col·laboradors tipus 1 i 2   |
| TNF               | de l'anglès, <i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>   |
| V                 | Volt  |
| v/v               | volum/volum   |



## **INTRODUCCIÓ**



## 1. LA TERÀPIA IMMUNOSUPRESSORA AL TRASPLANTAMENT

El trasplantament d'un òrgan o teixit d'un individu donant a un pacient receptor genera una resposta immunològica, anomenada resposta al·loimmune, que si no s'atura adientment condueix al rebuig per part del pacient receptor de l'òrgan trasplantat. Per aquest motiu és imprescindible l'aplicació d'una teràpia immunosupressora adequada que bloquegi de forma efectiva la resposta al·loimmune. Actualment, els protocols utilitzats en la teràpia del trasplantament combinen l'administració de dos o més fàrmacs en dosis baixes suficients per mantenir un correcte nivell d'immunosupressió i minimitzar l'aparició d'efectes secundaris produïts per l'administració continuada dels mateixos (Kahan, 2002).

Des del 1950 i fins a començaments de la dècada dels 80, els fàrmacs més emprats eren els esteroides, que inhibeixen la síntesi de la IL1 bloquejant així la síntesi de nombroses molècules pro-inflamatòries i alguns inhibidors de la proliferació limfocitària, com la azatioprina, que és un anàleg de les purines que evita la síntesi d'àcids nucleics. La identificació de la ciclosporina A (CsA) al 1980 i posteriorment el FK506 a la dècada dels 90, va suposar una revolució en la teràpia del trasplantament i va significar un punt d'inflexió ja que va millorar enormement la supervivència de l'al·loinjert, alhora que va disminuir de forma considerable els episodis de rebuig agut i les complicacions relacionades amb l'ús de dosis altes d'esteroides. Posteriorment, s'han identificat altres fàrmacs inhibidors de la proliferació limfocitària com el micofenolat mofetil, que és un etil éster de l'àcid micofenòlic, que inhibeix selectivament la síntesi *de novo* de purines i l'expressió de molècules d'adhesió. També s'han desenvolupat anticossos anti-limfocitaris policlonals o monoclonals com l'OKT3, que bloqueja selectivament al component  $\epsilon$  del complex CD3 dels limfòcits T i inhibeix la seva funció efectora, o l'anti-CD25 que s'uneix específicament als limfòcits T activats perquè la molècula CD25 del receptor de la IL2 s'expressa únicament després de l'estimulació limfocitària causada per l'antigen. L'any 1999 es va identificar un altre immunosupressor, la rapamicina, que és un inhibidor de la proteïna mTOR (per *mammalian target of rapamycin*) que està implicada en la progressió del cicle cel·lular, la síntesi de proteïnes i la proliferació cel·lular. Més recentment, s'ha desenvolupat l'everolimus, un derivat de la rapamicina que presenta millors característiques farmacocinètiques que aquesta. L'everolimus està aprovat per poder ser emprat a Europa, però encara està pendent d'aprovació per part de l'agència FDA (per *food and drug administration*) per poder ser utilitzat als USA (Kahan, 2003).

Degut al seu alt potencial terapèutic immunosupressor, els fàrmacs inhibidors de calcineurina, CsA i FK506, s'inclouen habitualment en els protocols emprats en la teràpia del trasplantament així com en el tractament de malalties autoimmunes. Malauradament, la seva administració continuada promou l'aparició de severes efectes secundaris, com neurotoxicitat, nefrotoxicitat, risc augmentat de patir càncer, hipertensió i diabetis. Per aquest motiu en els darrers anys s'està realitzant un esforç important en identificar i caracteritzar proteïnes i/o

molècules amb funció immunosupressora que puguin ser emprades en un futur com a eines alternatives als fàrmacs disponibles en l'actualitat.

El treball realitzat en aquesta Tesi ha intentat contribuir-hi caracteritzant el paper inhibidor de la família de les proteïnes reguladores de la calcineurina (RCAN, per *Regulator of Calcineurin*) envers l'activació limfocitària mediada per calcineurina, així com desenvolupant un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la interacció RCAN1-calcineurina que pot ser emprat per identificar noves molècules amb potencial immunosupressor.

## 2. LA CALCINEURINA

Calcineurina (Cn, formalment denominada com PPP3, abans PP2B) és l'única serina-treonina fosfatasa dependent de  $Ca^{2+}$  i de calmodulina (CaM) descrita fins al moment. Cn és un heterodímer format per dues subunitats: la subunitat catalítica A (CnA) amb un pes molecular al voltant de 58-69 kDa, segons la isoforma, i la subunitat reguladora B (CnB) amb un pes molecular de 16-19 kDa (Klee et al., 1979).

A mamífers existeixen tres isoformes de la CnA: CnA $\alpha$ , CnA $\beta$  i CnA $\gamma$ , que són els productes de tres gens diferents, *PPP3CA*, localitzat al cromosoma 4 (4q24) (Giri et al., 1991); *PPP3CB*, localitzat al cromosoma 10 (10q22.2) (Muramatsu and Kincaid, 1992) i *PPP3CC*, localitzat al cromosoma (8p21.3) (Wang et al., 1996a), respectivament. La conservació d'aminoàcids entre les diferents isoformes, exceptuant els extrems N i C-terminals, mostra entre un 83-89% d'identitat (Klee et al., 1998).

Pel que fa a la CnB, a mamífers s'expressen dues isoformes: CnB1 i CnB2 productes de dos gens diferents, *PPP3R1*, localitzat al cromosoma 2 (2p15) (Wang et al., 1996a) i *PPP3R2*, localitzat al cromosoma 9 (9q31.1), respectivament.

L'expressió de Cn és ubíqua a tots els teixits en mamífers, encara que està present a concentracions deu cops més altes en cervell i múscul que en altres tipus cel·lulars. Pel que fa a la CnA, la isoforma CnA $\alpha$  predomina a cervell, CnA $\beta$  sembla ser particularment important a limfòcits i CnA $\gamma$  en canvi és específica de testicle (Muramatsu and Kincaid, 1992). Pel que fa a la CnB, mentre que l'expressió de CnB1 és ubíqua, la de la CnB2 es restringeix a testicle (Wang et al., 1996a).

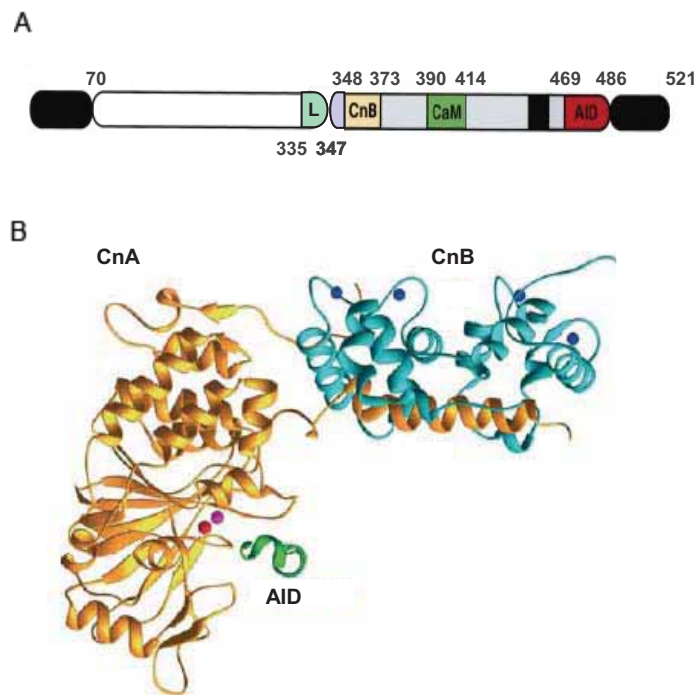
## 3. ESTRUCTURA DE LA CALCINEURINA

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la Cn és un heterodímer format per dues subunitats: la CnA i la CnB (Figura 1B).

La CnA $\alpha$  conté un domini catalític (residus 70-333), una regió anomenada *linker* localitzada entre el domini catalític i el domini d'unió a la CnB (residus 335-347), un domini d'unió a la CnB (residus 348-373), un domini d'unió a la CaM (residus 390-414) i un domini autoinhibidor (AID, residus 469-486) (Figura 1A). El centre actiu de la Cn es troba en una butxaca del domini catalític i conté en el seu fons dos ions metàl·lics  $Fe^{3+}$  i  $Zn^{2+}$ . L'ió  $Zn^{2+}$

està coordinat amb les cadenes laterals dels residus Asp118, Asn150, His199 i His281, mentre que l'ió  $Fe^{3+}$  ho està amb Asp90, His92 i Asp118. A més, els residus Arg122, His151, His155, Tyr159, Phe160, Trp232, Asp234, Arg254, Phe306 i Tyr311 estan també situats al centre actiu o en regions properes (Ke and Huai, 2003).

La CnB està formada per dos dominis d'unió a  $Ca^{2+}$ , el domini 1 (residus 1-84) i el domini 2 (residus 86-169). Cada domini conté dos motius *EF hand* d'unió a  $Ca^{2+}$  similars als que també estan presents a la CaM. A més, una glicina localitzada al seu extrem N-terminal conté un grup miristil (Ke and Huai, 2003). La presència d'aquest grup miristil sembla que estabilitza la proteïna a altes temperatures (Kennedy et al., 1996).



**Figura 1. Estructura de la Cn.** A. Representació esquemàtica de les tres isoformes presents a mamífers de la CnA. En negre, es mostren les regions variables dels extrems N i C-terminal així com una inserció de 10 aminoàcids, conseqüència del *splicing* alternatiu que ocorre en les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  de la CnA de mamífers. En color blau s'indica el linker (L), en carbassa el domini d'unió a la CnB, en verd el domini d'unió a la CaM i en vermell el domini AID. També s'indiquen els residus compresos dins cada domini corresponents a la isoforma de la CnA $\alpha$ . B. Estructura tridimensional de l'heterodímer de Cn inactiu. En groc, es mostra la CnA i en blau la CnB. En verd, el domini AID. Els àtoms de  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  i  $Ca^{2+}$  es mostren en vermell, rosa i blau, respectivament (*figures adaptades de Klee i col. 1998 i de Ke i Huai, 2003, respectivament*).

## 4. REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA DE LA CALCINEURINA

L'activitat fosfatasa de Cn consisteix en la transferència de manera directe d'un grup fosforil d'un residu serina o treonina a l'aigua sense que es formi cap enzim intermediari fosforilat. S'han descrit diversos mecanismes de regulació de l'activitat fosfatasa de Cn.

### 4.1. Regulació dependent de $\text{Ca}^{2+}$ i CaM

L'activació de Cn depèn de la unió de  $\text{Ca}^{2+}$  a la CnB així com de la unió dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  d'una molècula de CaM per cada molècula de Cn. L'estimulació cooperativa de la CaM dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  permet a la Cn respondre a increments lleugers en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$ . Per això l'activació de Cn en cèl·lules es produeix en presència de concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  dins del rang 0,5-1  $\mu\text{M}$  (Stemmer and Klee, 1994).

El mecanisme d'activació a través del  $\text{Ca}^{2+}$  i la CaM requereix un canvi conformacional de l'estructura de Cn: en cèl·lules no estimulades on el nivell de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular és baix, la Cn és incapaç d'interaccionar amb la CaM i l'enzim està inactiu. Estructuralment, la Cn presenta el domini AID cobrint la part superior del seu centre actiu i per tant inhibint la seva activitat fosfatasa (Figura 1B). En canvi, quan s'incrementa la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular de  $10^{-7}\text{M}$  a  $10^{-6}\text{M}$ , aquest s'uneix a la CnB. Aquest fet promou un canvi conformacional en la CnA que fa que el domini d'unió a la CaM sigui exposat. L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$ , que també activa la CaM, promou que la CaM activada s'uneixi a la CnA i desplaci de manera reversible el domini AID del centre actiu la qual cosa produeix l'activació de la Cn (Shibasaki et al., 2002; Yang and Klee, 2000).

### 4.2. Regulació dependent de l'estat oxidatiu

Com s'ha comentat anteriorment, la Cn té en el seu centre actiu dos ions metàl·lics, ferro i zinc. Quan la Cn no està activada l'estat dels ions és  $\text{Fe}^{3+}\text{-Zn}^{2+}$  mentre que quan està activada és  $\text{Fe}^{2+}\text{-Zn}^{2+}$ . Un cop la Cn és activada, els ions s'exposen a l'efecte oxidant dels anions superòxid  $\text{O}_2^-$  suggerint que l'estrès oxidatiu pot regular l'activitat de Cn (Aramburu et al., 2000). De fet, *in vivo* s'ha demostrat que l'enzim superòxid dismutasa (SOD) protegeix a la Cn perquè evita l'oxidació del  $\text{Fe}^{2+}$  del centre actiu (Wang et al., 1996b) i que la inhibició de SOD incrementa la quantitat del factor de transcripció CREB (per *cAMP-response element binding*) fosforilat probablement perquè inactiva la Cn (Bito et al., 1996).

### 4.3. Altres mecanismes de regulació

A més de l'estreta regulació a través de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM i per estrès oxidatiu, alguns autors han mostrat que la Cn de cervell conté quantitats estequiomètriques de fosfat unit a ella, suggerint que la Cn podria ser fosforilada *in vivo* (King and Huang, 1984). Altres grups han

demonstrat que la Cn pot ser fosforilada *in vitro* per diverses quinases, però en cap cas, s'ha determinat que l'estat de fosforilació afecti significativament la seva activitat fosfatasa (Klee, 1999).

Per altra banda, alguns autors també han suggerit que l'activitat fosfatasa de la Cn podria estar afectada pels fosfolípids, activant-la o inhibint-la en funció del fosfolípid i del substrat analitzat (Politino and King, 1987). En aquest sentit, s'ha determinat que la Cn recombinant de *Dictyostelium discoideum* s'activa en presència d'àcid araquidònic i àcids grassos de cadena llarga (Kessen et al., 1999). Aquests efectes podrien tenir rellevància fisiològica ja que Cn pot trobar-se associada a membranes.

## 5. SUBSTRATS DE LA CALCINEURINA

S'ha descrit que l'especificitat de desfosforilació de substrats per Cn no és deguda al reconeixement d'una determinada seqüència consens, sinó que ve definida tant per l'estructura primària, com per la secundària, terciària i quaternària de la proteïna (Blumenthal et al., 1985; Donella-Deana et al., 1994). A més, la Cn no només interacciona amb els residus fosforilats en una seqüència o en un context estructural a través del seu centre actiu sinó que conté altres regions específiques, diferents d'aquest, encarregades de reconèixer alguns substrats (Aramburu et al., 1998; Aramburu et al., 1999).

Malgrat que l'activitat fosfatasa de Cn implica la desfosforilació de residus serina o treonina, alguns autors han demostrat que la Cn també pot desfosforilar *in vitro* residus tirosina. Aquesta funció s'ha confirmat *in vivo* perquè Cn és la responsable de desfosforilar residus tirosina dels canals de Cl<sup>-</sup> regulats per insulina en l'epiteli renal (Marunaka et al., 1998).

Originalment, la Cn va ser descrita com una fosfatasa amb un ventall curt de substrats, la majoria d'ells inicialment identificats *in vitro*. Entre aquests es troben diverses proteïnes expressades a cervell com l'inhibidor-1 i DARP-32, ambdós inhibidors endògens de la proteïna fosfatasa 1 (PP1)(King et al., 1984); les proteïnes TAU, MAP-2 i tubulina associades a microtúbuls (Goto et al., 1985), la subunitat reguladora RII de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (PKA)(Blumenthal et al., 1986) i les defosfines, entre elles l'amfifisina I (Bauerfeind et al., 1997). En els darrers anys, s'ha confirmat que algunes d'aquestes proteïnes també són substrats *in vivo* de Cn. A més, també s'han identificat altres substrats *in vivo* de Cn prèviament no descrits: la proteïna I $\kappa$ B $\beta$  (Biswas et al., 2003) que regula els factors de transcripció NF $\kappa$ B, l'enzim NO sintasa (Dawson et al., 1993); MEF2 (per *myocyte-enhancer factor 2*) i Elk-1 (Tian and Karin, 1999), ambdós factors de transcripció; hsp25, proteïna de shock tèrmic (Gaestel et al., 1992) i BAD, membre de la família Bcl-2 (Wang et al., 1999). D'entre tots ells, els més ben estudiats són la família de factors de transcripció NFAT (per *nuclear factor of activated T cells*) (Crabtree and Clipstone, 1994; Rao, 1994).

## 6. LA FAMÍLIA DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ NFAT

La família de factors de transcripció NFAT està formada per cinc membres: NFATc1 (també conegut com NF-ATC, NFATc, NFAT2), NFATc2 (NF-ATP, NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFAT4, NFATX), NFATc4 (NFAT3) i NFAT5 (TONEBP). Mentre que els quatre primers estan regulats mitjançant un senyal de  $Ca^{2+}$  a través de Cn, NFAT5 respon a senyals d'estrès osmòtic (Macian et al., 2001).

D'aquí en endavant, totes les dades contingudes en aquesta Introducció faran referència als membres de la família NFATc1 al c4. Així mateix, quan es descrigui algun efecte o funció propi d'un determinat membre de la família, s'utilitzarà el nom de la isoforma responsable. En cas que l'explicació correspongui als membres de la família NFATc1-c4, únicament s'utilitzarà el nom genèric NFAT.

Els NFATc1, NFATc2 i NFATc3 s'expressen principalment en cèl·lules del sistema immunitari on juguen un paper crucial en la regulació de multitud de gens induïts durant la resposta immune. A més, els cinc membres de la família també s'expressen en altres teixits fora del sistema immunitari i també participen en la regulació de diversos processos biològics (Macian et al., 2001).

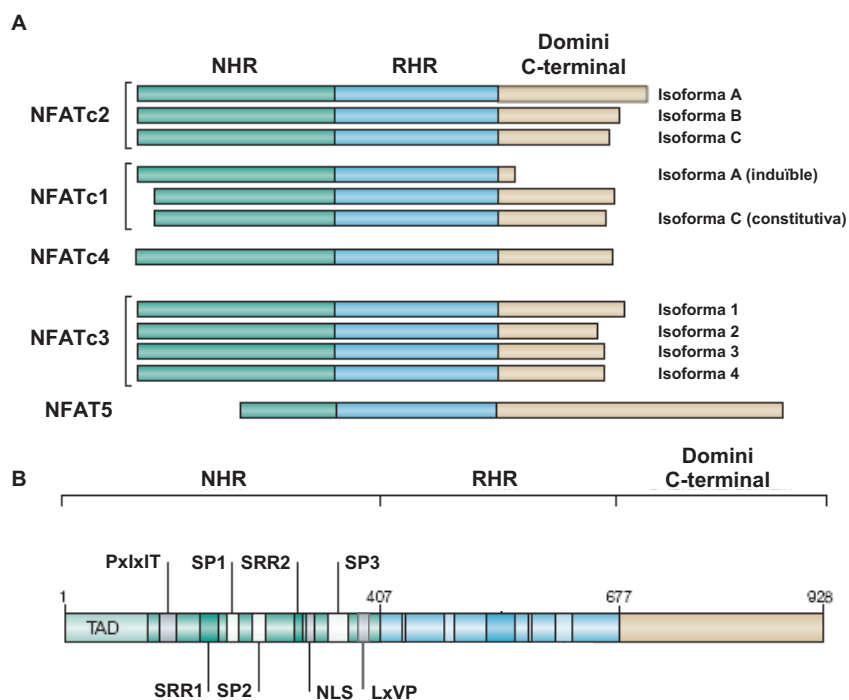
Per últim, remarcar que els NFAT només s'expressen als vertebrats tot i que la senyalització mediada per  $Ca^{2+}$  (entrada de  $Ca^{2+}$ , via de senyalització cel·lular  $Ca^{2+}$ -CaM-Cn, així com les quinases que fosforilen els NFAT) estan conservades en tota l'*Eukarya* (Graef et al., 2001a; Myers et al., 2000; Yeromin et al., 2004). Aquesta dada ha portat a alguns autors a suggerir que, des d'un punt de vista evolutiu, els NFAT haurien sorgit per cobrir les necessitats que genera el desenvolupament d'un organisme complex: un sistema immunitari recombinatorial, un sistema nerviós capaç de respondre ràpidament a senyals provinents de l'entorn, un cor compartimentalitzat capaç de bombejar sang a alta pressió, una musculatura més desenvolupada, entre d'altres. Tot això, permetria als vertebrats d'adaptar-se adequadament a l'ambient (Wu et al., 2007b).

### 6.1. Estructura dels factors de transcripció NFAT

Tots els NFAT tenen un domini d'unió al DNA molt conservat que es troba relacionat estructuralment amb el domini d'unió al DNA de la família de factors de transcripció Rel també coneguts com NF $\kappa$ B (Figura 2A). Aquesta regió homòloga a la de les proteïnes Rel (RHR), comú a totes les proteïnes NFAT, els proporciona una capacitat d'unir-se al DNA específica. A més del domini RHR, els NFAT també tenen un domini regulador conegut com la regió d'homologia dels NFAT (NHR). Aquest domini NHR està moderadament conservat en la família i inclou un potent domini de transactivació (TAD) així com nombrosos residus serina que es troben fosforilats en cèl·lules no estimulades (SRR1 i 2 i SP1, 2 i 3) (Aramburu et al., 2000). A més, també conté el motiu d'ancoratge a Cn, el motiu PxlxlT (Aramburu et al., 1998), i també un altre motiu d'unió a Cn, el motiu LxVP (Park et al., 2000)(Figura 2B). El



motiu PxlIT, que s'ha suggerit recentment que interacciona amb Cn a través d'una regió propera al *linker* de CnA (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007), està ben conservat entre els diversos membres de la família, mentre que el motiu LxVP, no ho està tant (Macian, 2005). Mentre que la unió dels NFAT a Cn a través del PxlIT té lloc tant si Cn està activada com si no, la unió a través del LxVP es produeix preferentment quan Cn està activada (Martinez-Martinez et al., 2006). A més, mentre que LxVP inhibeix fortament l'activitat fosfatasa de Cn, el PxlIT no ho fa (Aramburu et al., 1998). Per això, alguns autors han suggerit que el motiu PxlIT seria l'encarregat d'ancorar inicialment NFAT a Cn, perquè posteriorment el motiu LxVP pogués interaccionar amb el segon lloc d'unió a NFAT present a la fosfatasa (Martinez-Martinez et al., 2006).



**Figura 2.** A. Família de factors de transcripció NFAT, on es mostren els cinc membres caracteritzats fins ara així com les diferents isoformes de cada proteïna. En el NFATc1 s'indica en parèntesi si la seva expressió és induïble o constitutiva. B. Esquema on s'indiquen els diferents motius importants dels NFAT explicats en detall al text (*figura adaptada de Macian, 2005*).

Tant l'estructura primària com la regulació són notablement diferents entre NFAT5 i la resta de membres de la família, donat que NFAT5 conté el domini RHD però no té el domini NHR (Figura 2A). Això ha portat a alguns autors a suggerir que, des d'un punt de vista evolutiu, els factors del NFATc1 al c4 podrien haver aparegut per recombinació d'un exó que contindria la regió responsable de la translocació nuclear de NFAT, amb el domini RHD probablement de NFAT5 (Figura 2A). Posteriorment i per duplicació gènica, haurien aparegut els NFATc1-c4 tal i com es coneixen actualment (Graef et al., 2001a; Wu et al., 2007b).

## 6.2. Regulació de la translocació dels factors de transcripció NFAT

En cèl·lules no estimulades, els NFAT es troben altament fosforilats en residus serina i localitzats al citoplasma, però quan són desfosforilats per l'activitat fosfatasa de Cn, transloquen ràpidament a nucli (Macian, 2005). La desfosforilació dels NFAT per part de la Cn provoca un canvi conformacional que fa que els factors de transcripció exposin una seqüència de localització nuclear (NLS, per *nuclear localization signal*) que s'uneix a importines i permet l'entrada dels NFAT a nucli. Simultàniament a l'exposició de la NLS també s'emascara una seqüència d'export nuclear (NES, per *nuclear export sequence*) que serà la responsable juntament amb la exportina CRM1 de revertir la translocació dels NFAT i treure'ls del nucli al citoplasma. El motiu SRR1 controla l'exposició de la seqüència NLS i l'accessibilitat de la Cn pels altres residus fosforilats, mentre que els motius SP1 i SP2, controlen l'exposició de la seqüència NES, l'export nuclear i l'afinitat d'unió dels NFAT a DNA.

L'estat de fosforilació dels NFAT està finament regulat gràcies a la participació de diverses quinases. Aquestes quinases poden classificar-se com a quinases de manteniment o quinases d'export (Gwack et al., 2007). Les primeres s'encarreguen de fosforilar i mantenir els NFAT al citoplasma en cèl·lules no estimulades, mentre que les segones són les responsables de fosforilar els NFAT al nucli per a que puguin retornar al citoplasma. Hi ha tres famílies de quinases que actuen conjuntament en la fosforilació dels NFAT: CK1 (per *casein kinase-1*), DYRK (per *dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase*) i GSK3 (per *glycogen synthase kinase-3*). A més, les MAP quinases també participen potenciant la capacitat de la CK1 de promoure la sortida dels NFAT de nucli, mentre que AKT fosforila GSK3 i la inactiva, de tal manera que promou la localització dels NFAT a nucli. Així doncs, la quantitat de NFAT localitzat al nucli dependrà tant del senyal de  $Ca^{2+}$  com de les quinases que estiguin activades en unes determinades condicions d'estimulació.

## 6.3. Regulació transcripcional dependent dels factors de transcripció NFAT

La unió de factors de transcripció sinèrgics en els promotors o en les regions *enhancer* dels gens, pot donar-se simplement com la unió de factors de transcripció de manera individual a llocs d'unió adjacents, o bé com la cooperació de factors de transcripció capaços d'unir-se a llocs d'unió compostos. La interacció amb aquests llocs d'unió compostos implica no només sinergia entre els factors de transcripció sinó també la cooperació física entre ells. Com a resultat s'obté una interacció complex-DNA molt més estable que la que s'obtidria de la unió individual dels factors de transcripció al mateix lloc d'unió compost. A més, aquest mecanisme permet integrar simultàniament múltiples vies de senyalització cel·lular i regular estrictament la transcripció de multitud de gens.

Els NFAT són un d'aquests tipus de factors de transcripció que cooperen amb altres per regular el nivell d'expressió dels seus gens diana. Els NFAT, de manera individual tenen

poca afinitat per unir-se al DNA, però en canvi quan cooperen amb altres factor de transcripció donen lloc a heterodímers altament estables amb el DNA. A continuació es detalla quins són els factors de transcripció amb els quals els NFAT cooperen.

### 6.3.1. Homodímers de NFAT

Donat que el domini RHR dels NFAT és estructuralment homòleg al domini Rel, en algunes ocasions les proteïnes NFAT poden funcionar com factors de transcripció dimèrics capaços d'unir-se a llocs d'interacció que s'assemblen als llocs d'unió de NF $\kappa$ B (Goldfeld et al., 1993; McCaffrey et al., 1994). Aquest dímers són dèbils, no estableixen relació de cooperació entre ells i es formen únicament en presència de DNA. Per exemple, el promotor de TNF (per *tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)*) conté un lloc d'unió anomenat  $\kappa$ 3 semblant al de NF $\kappa$ B al qual poden unir-se tant homodímers de NFAT com dímers formats per proteïnes Rel.

### 6.3.2. Cooperació NFAT:AP1

Els factors de transcripció AP1 (per *activator protein 1*) estan formats per homodímers o heterodímers de les proteïnes Jun (Jun, JunB i JunD) i Fos (cFos, FosB, Fra1 i Fra2). La unió al DNA l'estableixen a través d'una regió bàsica conservada mentre que la interacció entre ells la fan a través dels seus dominis de cremalleres de leucines (Glover and Harrison, 1995).

La unió individual dels factors de transcripció NFAT i dels AP1 al DNA es caracteritza per tenir poca afinitat, però la cooperació d'ambdós factors de transcripció estableix una unió complex-DNA molt estable. Tot i que els dímers Fos-Jun poden unir-se als llocs d'unió d'AP1 en qualsevol de les dues orientacions, el complex cooperatiu que estableix amb NFAT té l'orientació específica NFAT-Jun-Fos per poder-se unir adequadament als seus llocs d'unió compostos (Chen et al., 1998; Diebold et al., 1998).

La cooperació NFAT:AP1 s'ha demostrat en les regions promotores o *enhancers* de diversos gens, majoritàriament citoquines, expressades en cèl·lules del sistema immunitari: el promotor de la *IL2* conté dos o tres llocs d'unió compostos putatius (Jain et al., 1995; Rooney et al., 1995); la regió *enhancer* de *CSF2* (per *colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)*) conté tres (Cockerill et al., 1995); el promotor de la *IL4* conté un mínim de tres llocs (Burke et al., 2000; Rooney et al., 1995; Takemoto et al., 1997); la *IL3*, *IL5* i *IFNG*, tenen com a mínim un al seu promotor, mentre que la *IL13* en conté un a una regió reguladora distal (Macian et al., 2000; Rao et al., 1997); *FASLG*, *CD25* i *COX-2* també en tenen als seus promotors (Iniguez et al., 2000; Latinis et al., 1997; Schuh et al., 1998).

### 6.3.3. Cooperació NFAT:GATA

En els darrers anys, s'ha caracteritzat també la cooperació entre els NFAT i diferents membres de la família de proteïnes GATA. Mentre que la interacció NFATc4:GATA4 és important pel creixement dels cardiomiòcits i el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca (Molkentin et al., 1998), la de NFATc1:GATA2 és crucial en el desenvolupament de la hipertròfia de múscul esquelètic (Molkentin et al., 1998; Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). A més, els complexos NFAT:GATA3 són responsables de la transcripció de *IL4* imprescindible en la diferenciació de cèl·lules precursors T a llinatge Th2 (Avni et al., 2002).

### 6.3.4. Cooperació NFAT:MEF2

Aquests complexos estimulen la transcripció de diversos gens implicats en el canvi de fenotip de fibres de múscul esquelètic ràpides a fibres lentes (Blaeser et al., 2000). A més també són responsables de l'expressió de Nur77 necessari per l'apoptosi de cèl·lules T (Youn et al., 2000).

### 6.3.5. Cooperacions amb altres factors de transcripció

A més, també s'ha descrit que els NFAT poden establir complexos amb altres factors de transcripció i modular així més finament l'expressió gènica d'algunes citoquines.

Per exemple, mentre que la cooperació de NFAT i AP1 estimula la transcripció de *IL2*, quan els NFAT cooperen amb PPAR- $\gamma$  (per *peroxisome proliferator-activated receptor-\gamma*) o amb p21<sup>SNFT</sup> (per *21-kDa small nuclear factor isolated from T cells*) (Iacobelli et al., 2000; Yang et al., 2000b) inhibeixen l'efecte dels NFAT envers el promotor de la *IL2*. El mateix efecte inhibitori ocorre respecte l'expressió gènica de diverses citoquines quan els NFAT cooperen amb el factor de transcripció ICER (per *inducible cyclic AMP early repressor*) (Bodor and Habener, 1998). En canvi, la interacció dels NFAT amb els factors de transcripció OCT (per *octamer binding transcription factor*) estimula la transcripció de la *IL3* (Duncliffe et al., 1997), amb MAF o IRF4 (per *interferon regulator factor 4*) estimula la *IL4* (Ho et al., 1996; Rengarajan et al., 2002) i amb T-bet, estimula l'expressió gènica de *IFNG* (Lee et al., 2004).

Recentment, s'ha descrit que en cèl·lules T reguladores (Treg) els NFAT formen heterodímers amb el factor de transcripció FOXP3 (per *forkhead box protein*) específic de Treg. La interacció de NFAT amb FOXP3 desplaçaria el complex NFAT:AP1 dels seus llocs d'unió compostos (Bettelli et al., 2005; Wu et al., 2006).

## 7. EFECTES FUNCIONALS DE LA CALCINEURINA

Com s'ha comentat anteriorment, l'expressió de la Cn és ubiqua. En aquest apartat només es detallarà la funció de la fosfatasa en aquells teixits en els que la seva funció és més rellevant.

### 7.1. Funció de la Cn a cervell

A cervell, la Cn representa l'1% de la proteïna total i està implicada en multitud de processos biològics: regulació dels inhibidors de la PP1 (King et al., 1984), sinaptogènesi i extensió de les neurites promogudes per la família de proteïnes calpacitines (Lautermilch and Spitzer, 2000), regulació d'enzims com la sintasa de l'òxid nítric neuronal (nNOS) crucial en la neurotransmissió (Bon and Garthwaite, 2003), regulació de l'alliberament de neurotransmisors mediada per la proteïna sinapsina I (Jovanovic et al., 2001), el reciclatge vesicular en el que participen les desfosfines (Cousin and Robinson, 2001) i reciclatge dels receptors dels neurotransmisors com els NMDA (per *N-methyl-D-aspartic acid*) (Lieberman and Mody, 1994), aprenentatge i memòria a llarg termini mitjançant la regulació de dos fenòmens electrofisiològics oposats, la LTP (per *long term potentiation*) i la LTD (per *long term depression*) (Lisman, 1989), inhibició de l'expressió mediada a través dels factors de transcripció CREB, implicat en memòria i aprenentatge (Hagiwara et al., 1992) i estimulació de l'expressió gènica mediada per NFAT, implicat en regular l'excitabilitat cel·lular (Graef et al., 1999), entre d'altres processos descrits. A més, models murins deficientes en *CnB1* mostren severes defectes en el creixement axonal promogut com a resposta a neurotrofines o netrina-1 (Graef et al., 2003), així com hiperreactivitat i dèficits en l'establiment de la memòria a curt termini (Zeng et al., 2001).

En algunes patologies neuronals s'ha suggerit la participació de Cn:

- Alzheimer: L'activitat de Cn és important en la regulació de la integritat i remodelació del citoesquelet neuronal perquè desfosforila les proteïnes tubulina, MAP2 i TAU permetent que s'incrementi l'estabilitat dels microtúbuls (Mandelkow et al., 1995). Els pacients d'Alzheimer presenten quantitats anormals de proteïna TAU hiperfosforilada que correlaciona amb una disminució de l'activitat fosfatasa de la seva Cn (Ladner et al., 1996). Aquestes dades han suggerit la participació de Cn en el desenvolupament de processos neurodegeneratius (Winder and Sweatt, 2001).

- Excitotoxicitat: L'activació anòmla de l'activitat fosfatasa de Cn pot generar un excés d'òxid nítric (NO), donat que l'enzim nNOS és substrat de Cn, i provocar excitotoxicitat neuronal (Choi, 1988).

- Esquizofrènia: La generació de mutants deficientes en *CnB1* ha mostrat alteracions en la conducta similar a la dels malalts que pateixen esquizofrenia (Miyakawa et al., 2003).

## 7.2. Funció de la Cn a cor

En aquest teixit, la Cn està implicada en el desenvolupament cardíac i la generació d'hipertrofia mediada per la participació dels factors de transcripció NFATc4, GATA4 i MEF2 (Molkentin et al., 1998; Passier et al., 2000), el desenvolupament de les vàlvules cardíques i la formació del septum (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998a), el correcte ensamblatge del sarcòmers i la inducció de gens cardíacs fetals juntament amb la repressió de les corresponents isoformes presents en l'adult (Frey et al., 2000a).

La Cn també està implicada en el desenvolupament d'algunes malalties a cor:

- Hipertrofia cardíaca: Ratolins deficientes en *CnAβ* tenen cors més petits que els salvatges i no desenvolupen hipertrofia cardíaca davant diversos estímuls hipertrofiants (Bueno et al., 2002b). A més, també s'ha demostrat que en models transgènics que expressen una Cn constitutivament activada (CnA\*), l'administració d'inhibidors de Cn, CsA i FK506, bloqueja la hipertrofia cardíaca que presenten (Molkentin et al., 1998).

- Aturada cardíaca congestiva: Al miocardi de pacients que han patit aquest tipus d'atac s'ha determinat que Cn està elevada (Haq et al., 2001; Lim and Molkentin, 1999).

- Cardiomiopatia hipertrofica obstructiva i estenosis aòrtica: Al miocardi d'aquests pacients s'ha determinat un increment significatiu de l'activitat de Cn i de la translocació nuclear de NFATc1. A més, aquests pacients probablement tenen part de la Cn constitutivament activada degut a una proteòlisi del seu domini AID (Ritter et al., 2002).

## 7.3. Funció de la Cn a múscul esquelètic

A múscul esquelètic, la Cn està implicada en la diferenciació dels mioblastos perquè indueix l'expressió de la miogenina a través de l'activació dels factors de transcripció MEF2 i MyoD (Friday et al., 2003). També, intervé en la regeneració muscular com a resposta al dany (Abbott et al., 1998). A més, les fibres musculars esquelètiques adultes poden ser classificades generalment en dues categories: fibres lentes o ràpides, en funció de la seva capacitat de contracció, propietats metabòliques i patrons d'expressió gènica associats. La Cn és responsable del manteniment del fenotip lent de les fibres en condicions de contracció normal a través de l'activació transcripcional de gens específics de musculatura lenta mediada pels factors NFAT:MEF2 (Blaeser et al., 2000). A més, també és necessària perquè es produeixi el canvi de fenotip de fibra ràpida a lenta que té lloc en condicions de sobrecàrrega muscular compensatòria o exercici continuat (Talmadge et al., 2004). En canvi, pel que fa a la participació de la Cn en la inducció d'hipertrofia muscular els resultats obtinguts han estat més controvertits. Alguns autors han descrit que l'IGF-1 (per *insulin growth factor 1*), a través de la cooperació NFATc1:GATA2, indueix hipertrofia muscular (Molkentin et al., 1998; Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). En canvi, recentment la generació de models murins deficientes en *CnAβ* han suggerit que la Cn sí participa en el canvi de fenotip de les

fibres musculars però no en el creixement muscular en resposta a estímuls hipertròfics (Parsons et al., 2004).

S'ha descrit la participació de Cn en diverses patologies relacionades amb el múscul esquelètic:

- Regeneració muscular: Com a resposta al dany, el múscul esquelètic adult té una notable capacitat de regeneració. S'ha demostrat que l'activitat de Cn és necessària per la formació de miofibres noves i la diferenciació de les cèl·lules precursors de múscul (Friday et al., 2000; Sakuma et al., 2003).

- Atrofia muscular: Alguns autors han demostrat que la immobilització del múscul esquelètic causa atrofia i l'han relacionat amb un increment en la concentració de Cn. En canvi altres, han demostrat que l'activitat de Cn no està incrementada en aquestes condicions (Bodine et al., 2001; Childs et al., 2003).

- Alteració del transport de glucosa a múscul esquelètic: Els pacients amb diabetis tipus II presenten resistència a la insulina en el múscul esquelètic. S'ha demostrat que l'activació de la Cn augmenta la funció de la insulina a múscul esquelètic (Ryder et al., 2003).

#### **7.4. Funció de la Cn al sistema immunitari**

Particularment interessant és el paper de l'activitat de Cn al sistema immunitari, per això es descriurà en detall a l'apartat 8.

#### **7.5. Funció de la Cn en altres teixits**

En altres teixits s'ha demostrat la participació de Cn en el desenvolupament del sistema vascular permetent la correcta oxigenació i distribució dels vasos sanguinis a l'organisme (Graef et al., 2001b) així com la participació en angiogènesi (Hernandez et al., 2001), activació de la síntesi de surfactants essencials per prevenir el colapse alveolar a pulmó (Dave et al., 2006), regulació dels osteoblasts i osteoclasts necessaris per la formació dels ossos (Winslow et al., 2006), regulació del creixement i funció de les cèl·lules  $\beta$  productores d'insulina al pàncreas (Heit et al., 2006) i modulació del creixement i diferenciació de queratinòcits (Mammucari et al., 2005).

### **8. FUNCÍO DE LA CALCINEURINA AL SISTEMA IMMUNITARI**

El  $\text{Ca}^{2+}$  és un missatger secundari que juga un paper crucial en la senyalització de diversos tipus cel·lulars que formen part del sistema immunitari. A limfòcits B promou la seva activació i maduració; a mastòcits causa la degranulació i l'alliberament d'histamina; a cèl·lules *natural killer* promou l'activitat citolítica en resposta al reconeixement cèl·lula-diana; a cèl·lules dendrítiques (DC) estimula la seva maduració a partir de progenitors mieloides, l'expressió de molècules MHC (per *major histocompatibility complex*) de classe II i

co-estimuladores i la migració de DCs immadures a òrgans linfoides secundaris; a macròfags estimula l'expressió gènica de citoquines pro-inflamatòries i a neutròfils estimula la fagocitosi (Feske, 2007).

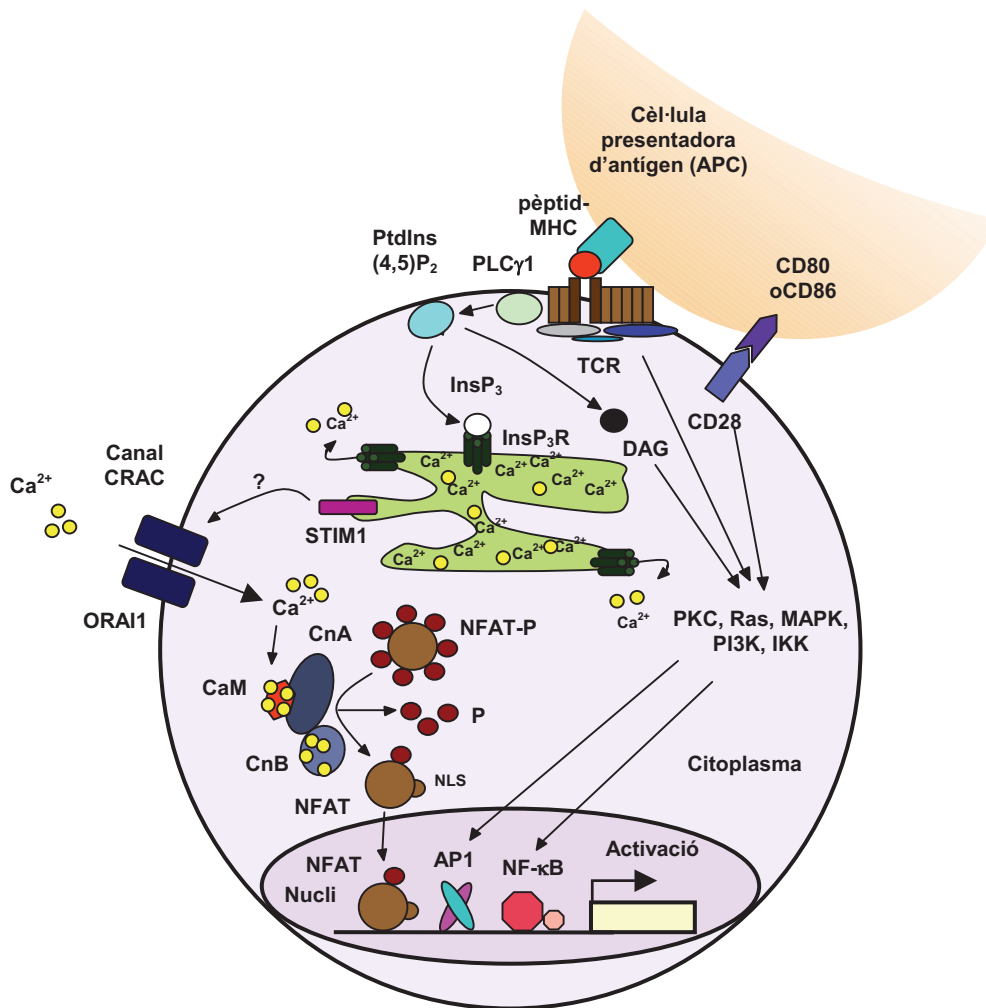
A limfòcits T, aquesta via de senyalització cel·lular participa en diversos processos biològics: regulació de la proliferació i desenvolupament de timòcits, diferenciació de les cèl·lules T col·laboradores, inducció de tolerància i activació limfocitària. Donada la importància de l'activació limfocitària en la realització d'aquesta Tesi, a continuació es descriurà en detall.

### 8.1. Activació limfocitària de cèl·lules T

L'activació limfocitària és la conseqüència final que resulta de la integració de tres senyals. La primera senyal, inicia l'activació limfocitària i consisteix en el reconeixement per part del TCR (per *T cell receptor*) present als limfòcits T, de l'antigen presentat en el context adient de MHC per part d'una cèl·lula presentadora d'antigen (APC). La segona senyal, ve donada per la interacció entre diverses molècules co-estimuladores com CD28, CTLA4 i CD40L presents a la membrana plasmàtica dels limfòcits T, amb els seus receptors localitzats a la membrana plasmàtica de les APC. Per últim, la tercera senyal es genera a partir de les citoquines secretades pel limfòcit T i que s'encarreguen d'activar els seus propis receptors presents a la seva membrana plasmàtica promovent l'amplificació de la senyal d'activació limfocitària (Kahan, 2003). L'activació completa de les cèl·lules T comportarà l'estimulació de la transcripció de multitud de citoquines *IL2*, *IL4*, *IL5*, *CSF2*, *CD40L*, *IFNG* i *TNF*, entre d'altres, així com la inhibició de molts altres gens com per exemple la quinasa 4 dependent de ciclina (*CDK4*) (Baksh et al., 2002).

L'activació via TCR promou que diverses proteïnes tirosina quinasa s'activin, entre elles, LCK (per *leukocyte-specific protein tyrosine kinase*) i ZAP70 (per *zeta-chain-associated protein kinase*), i comencin una cascada de fosforilacions de diverses proteïnes adaptadores, com ara la SLP76 (per *SH2-domain-containing leukocyte protein*) i LAT (per *linker for activation of T cells*). Això farà que es reclutin i s'activin la quinasa TEC i la fosfolipasa  $C\gamma 1$  ( $PLC\gamma 1$ ) (Figura 3). La  $PLC\gamma 1$  hidrolitzarà el fosfolipid de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfat ( $PtdIns(4,5)P_2$ ) en inositol-1,4,5-trifosfat ( $InsP_3$ ) i diacilglicerol (DAG).





**Figura 3.** Esquema de l'activació d'un limfòcit T. En groc es mostren els ions  $\text{Ca}^{2+}$ . En blanc i negre estan representats el  $\text{InsP}_3$  i el DAG, respectivament. (figura adaptada de Macian, 2005; Lee i Park, 2006).

### 8.1.1. Efecte de l' $\text{InsP}_3$ en l'activació de la família de factors de transcripció NFAT

L' $\text{InsP}_3$  s'uneix als seus receptors ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) localitzats a la membrana plasmàtica del reticle endoplasmàtic (RE) promovent la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  des dels reservoris intracel·lulars cap al citoplasma.

Als limfòcits T existeix un gradient en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el citoplasma i l'espai extracel·lular així com entre el citoplasma i la llum del RE (Feske, 2007). A fora de la cèl·lula la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  és  $10^{-3}$  M, mentre que al RE oscil·la entre 100-800  $\mu\text{M}$ . A més, la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  a l'interior de la cèl·lula està estrictament regulada i depèn de l'estat d'activació de la mateixa: en condicions de no estimulació és de  $10^{-7}$  M mentre que quan la cèl·lula T és activada i s'obren els canals CRAC (per *calcium-release-activated calcium channel*) incrementa lleugerament fins a  $10^{-6}$  M.

La disminució de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  a dins el RE és detectada per la proteïna STIM1 que serà la responsable de comunicar aquest senyal al canal CRAC, localitzat a la membrana plasmàtica, per que s'obri i permeti l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  des del medi extracel·lular a l'interior de la cèl·lula. Recentment, s'han identificat la proteïna STIM1 (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005), que actua de sensor dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  dins el RE, i ORAI1 (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006), que és una de les subunitats que formen el porus del canal CRAC, però el mecanisme pel qual aquesta senyal viatja des del RE a la membrana plasmàtica és desconegut. Sigui com sigui, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels canals CRAC, coneguda com *store-operated calcium entry* (SOCE), activa diversos enzims dependents de  $\text{Ca}^{2+}$ , entre ells, la Cn (Gwack et al., 2007) (Figura 3).

### 8.1.2. Efecte del DAG en l'activació de la família de factors de transcripció AP1 i $\text{NF}\kappa\text{B}$

Tal i com s'ha comentat anteriorment, la hidròlisi de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  per part de la  $\text{PLC}\gamma 1$  genera  $\text{InsP}_3$  i DAG. El DAG s'uneix a dos tipus d'enzims diferents: Ras-GRP (per *guanyl nucleotide-releasing protein*) i la proteïna quinasa C (PKC) (Gwack et al., 2007). Aquest fet promou l'activació de les vies de senyalització de les MAP quinases i de la quinasa de les  $\text{I}\kappa\text{B}$  (IKK), que finalment donaran lloc a l'activació dels factors de transcripció AP1 i  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , respectivament. A més, com a resposta a l'estimulació de les cèl·lules T a través del TCR, les proteïnes Jun i Fos es sintetitzen i s'activen post-traduccionament per fosforilació: per exemple, quinases de la família JNK (per *Jun N-terminal kinases*) fosforilen la proteïna Jun. Així doncs, els factors de transcripció NFAT, AP1 i  $\text{NF}\kappa\text{B}$  juntament amb altres factors de transcripció modulen la transcripció d'un gran nombre de gens reguladors de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules T.

Per altra banda, s'ha descrit que els factors de transcripció NFAT, AP1 i  $\text{NF}\kappa\text{B}$  són activats diferencialment en funció del tipus de senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  que estimula a la cèl·lula (Dolmetsch et al., 1997). Increments transitoris en forma de pics de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  generen una activació sostinguda de JNK i de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , però no de NFAT; mentre que increments perllongats de  $\text{Ca}^{2+}$ , que són incapaços d'activar a JNK o a  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , sí que són suficients per activar a NFAT. A més, la freqüència en les oscil·lacions de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  també activa específicament uns o altres factors de transcripció: oscil·lacions de baixa freqüència activen  $\text{NF}\kappa\text{B}$  mentre que les d'alta freqüència activen tant NFAT com  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Dolmetsch et al., 1998).

Aquestes dades indiquen que, tant la durada com la intensitat de la senyal de  $\text{Ca}^{2+}$ , juntament amb la participació de les vies de senyalització mediades per NFAT, AP1 i  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , entre d'altres factors de transcripció, regulen l'activació limfocitària.

## 8.2. Importància de la via de senyalització Ca<sup>2+</sup>-Cn-NFAT en l'activació limfocitària

Amb l'objectiu d'avaluar la importància de la via de senyalització Ca<sup>2+</sup>-Cn-NFAT en l'activació limfocitària s'ha estudiat el fenotip de pacients amb immunodeficiències hereditàries i s'han generat diversos models murins.

- Existeix un tipus d'immunodeficiència severa combinada (SCID, per *severe combined immunodeficiency*) que està causada per defectes en la via de senyalització del Ca<sup>2+</sup>. Els pacients amb SCID tenen la mutació Arg91Trp a la proteïna ORAI1, que forma part del porus dels canals CRAC, que causa que no puguin permetre l'entrada de Ca<sup>2+</sup> des de l'espai extracel·lular al citoplasma (SOCE). Com a conseqüència tenen defectes severes en la proliferació de cèl·lules T i no expressen multitud de citokines, entre elles, *IL2*, *IL4*, *IL10*, *IFNG* i *TNF*. A més també tenen defectes en cèl·lules B i fibroblasts (Feske et al., 2006).

- En els darrers anys s'han desenvolupat diversos models murins deficientes en les diferents isoformes de Cn o NFAT. A la Taula 1 es detalla el fenotip al sistema immunitari que presenten els diferents models generats.

Taula 1. Models de ratolins deficientes en proteïnes implicades en la via de senyalització Cn-NFAT.

| PROTEÏNES         | FENOTIP AL SISTEMA IMMUNITARI (*)  | REFERÈNCIES                 |
|-------------------|--|-----------------------------|
| CnA $\alpha$      | Desenvolupament normal del llinatge de cèl·lules T i B i recompte de cel·lules T CD4 o CD8 (SP) normal. Producció de IL2 i IL4 normal.   | (Zhang et al., 1996)        |
| CnA $\beta$       | Defecte notable en la maduració de cèl·lules T. Disminució significativa dels limfòcits T CD3 en la perifèria. Disminució del recompte de cèl·lules T CD4 o CD8 (SP). Disminució en la producció de IL2.   | (Bueno et al., 2002a)       |
| NFATc1            | Producció de IL4 i respostes de cèl·lules TH2 alterades. Repoblació del timus i dels òrgans linfoïdes alterada. En complementació amb un sistema deficient en RAG-2, reducció de la resposta proliferativa de cèl·lules T.   | (Ranger et al., 1998b)      |
| NFATc2            | Hiperproliferació moderada i esplenomegalia. Increment moderat de respostes de cèl·lules T i B, amb preferència cap a respostes TH2. Expressió prolongada de IL4 i disminució de la producció de IFNG en resposta a l'activació via TCR. Involució tímica endarrerida. | (Xanthoudakis et al., 1996) |
| NFATc3            | Desenvolupament de cèl·lules CD4 o CD8 (SP) alterat i increment de l'apoptosi dels timòcits DP. Lleugera hiperactivació de les cèl·lules T perifèriques.   | (Oukka et al., 1998)        |
| NFATc1/<br>NFATc2 | En el fetge fetal de quimeres, funcions efectores de les cèl·lules T molt alterades, amb defectes dramàtics envers la producció de citokines i l'activitat citolítica. Hiperactivitat de les cèl·lules B.  | (Peng et al., 2001)         |
| NFATc2/<br>NFATc3 | Hiperreactivitat del TCR amb desordres limfoproliferatius greus. Notable increment de les respostes de les cèl·lules TH2. Blefaritis alèrgica i neumonitis intersticial.   | (Ranger et al., 1998b)      |

(<sup>1</sup>) DP, significa doble positiu. SP, de l'anglès *single positive* (taula adaptada a partir de Feske i col., 2007 i Macian, 2005).

Aquests models *in vivo* mostren que la falta de CnA $\alpha$  dóna lloc a un fenotip al sistema immunitari menys sever que els deficientes en CnA $\beta$ . Això suggereix, que la CnA $\beta$  podria compensar la pèrdua de funció de CnA $\alpha$  en els ratolins CnA $\alpha$ <sup>-/-</sup>, mentre que a l'inrevés això no passaria. És a dir, la manca de CnA $\beta$  en els ratolins mutants CnA $\beta$ <sup>-/-</sup> no podria ser compensada per CnA $\alpha$ . Tot i això, hi han evidències de que CnA $\alpha$  s'expressa i és funcional en els limfòcits T dels ratolins CnA $\beta$ <sup>-/-</sup>, però no de manera suficient com per compensar la manca de CnA $\beta$ . Totes aquestes dades suggereixen que CnA $\beta$  seria la isoforma de CnA predominant en limfòcits T i B (Jiang et al., 1997).

En el cas dels NFAT, els mutants individuals *Nfatc1*<sup>-/-</sup>, *Nfatc2*<sup>-/-</sup> i *Nfatc3*<sup>-/-</sup>, mostren un fenotip amb només lleugeres alteracions al sistema immunitari. Únicament en els ratolins deficientes en dos membres simultàniament, *Nfatc1/Nfatc2*<sup>-/-</sup> o *Nfatc2/Nfatc3*<sup>-/-</sup> el fenotip mostrat és sever. Aquestes dades indiquen que entre els diferents membres de la família expressats a limfòcits T hi hauria certa redundància funcional. Això podria ser justificat pel fet de que els NFAT mostren una gran conservació del domini RHR, la qual cosa els confereix la capacitat d'unir-se al DNA en els mateixos llocs i actuar de forma cooperativa amb altres factors de transcripció comuns. Per altra banda, els fenotips mostrats pels ratolins també indiquen que determinades funcions serien exclusivament realitzades per determinats NFAT sense que, en absència d'aquest determinat membre, els altres poguessin compensar-les (Macian, 2005).

## 9. INHIBIDORS DE LA CALCINEURINA

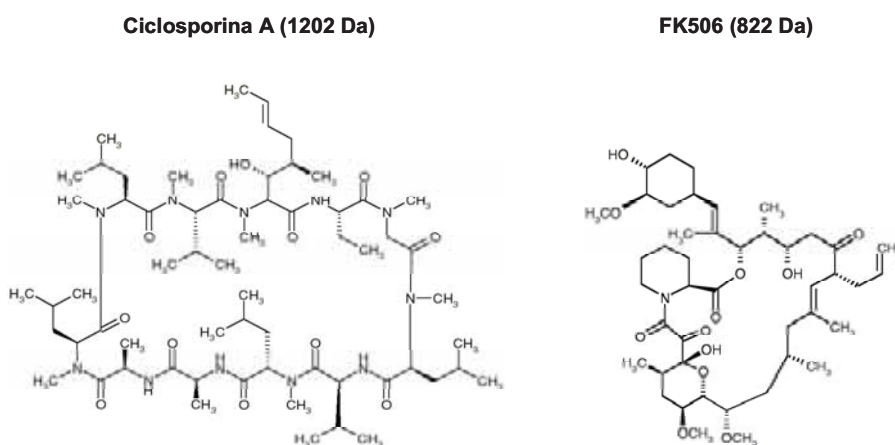
En els darrers anys, s'han identificat i caracteritzat funcionalment diversos inhibidors de Cn. Aquests, es poden classificar en quatre categories: inhibidors exògens clàssics, inhibidors endògens i cel·lulars, pèptids inhibidors i molècules inhibidores.

### 9.1. Inhibidors exògens clàssics: els fàrmacs CsA i FK506

La CsA i el FK506 són els inhibidors de Cn més potents i millor coneguts fins al moment. La CsA és un polipèptid cíclic d'onze aminoàcids que va ser aïllat del fong *Tolypocladium inflatum Gams* (Borel et al., 1976) mentre que FK506 és un antibiòtic macròlid aïllat de *Streptomyces tsukubaensis* (Kino et al., 1987). Degut a l'alt potencial immunosupressor d'ambdós fàrmacs, s'han emprat en la teràpia del trasplantament i en el tractament de malalties autoimmunes.

Tot i que CsA i FK506 són estructuralment diferents (Figura 4), el mode d'acció d'ambdós fàrmacs així com els seus efectes biològics i efectes secundaris adversos que promouen són bastant similars (Cardenas et al., 1998). Donat que ambdues molècules són de

baixa massa molecular i hidrofòbiques, poden travessar la membrana plasmàtica per difusió i un cop al citoplasma interaccionar amb uns receptors intracel·lulars anomenats immunofilines. La CsA interacciona amb la ciclofilina A (CyPA) mentre que FK506 ho fa amb la FKBP12 (per *FK506 binding protein 1A, 12 kDa*). En aquest sentit, la generació de models murins deficientes en CyPA ha mostrat que aquests ratolins són resistents a la immunosupressió amb CsA (Colgan et al., 2005).



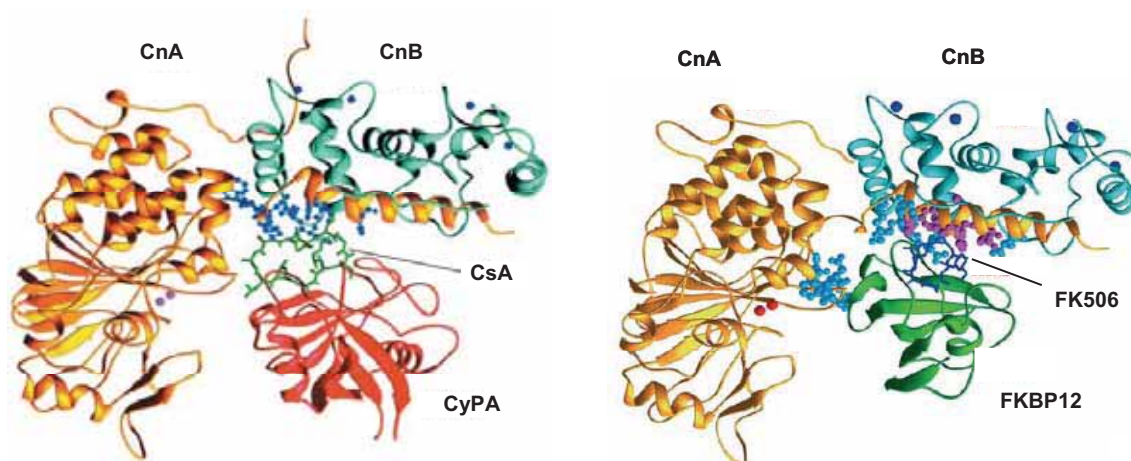
**Figura 4.** Estructures de la CsA i de FK506 (imatges extretes de la pàgina web de l'empresa farmacèutica LC Laboratories).

Les immunofilines constitueixen una família de proteïnes d'expressió ubíqua amb activitat peptidil-prolil isomerasa (Gothel and Marahiel, 1999). Es considera que els ribosomes sintetitzen les proteïnes amb els enllaços peptídics en *trans* perquè és l'estat de menys energia i per tant la configuració més estable. En algunes proteïnes que contenen aminoàcids prolina, els enllaços anteriors a aquests residus estan en *cis*, de tal manera que la isomerització dels enllaços és necessària pel correcte plegament de les proteïnes. Les immunofilines seran les encarregades d'estabilitzar aquesta transició *cis-trans* i accelerar la seva isomerització. La conformació del complex CsA-CyPA és molt similar a la del complex ternari CsA-CyPA-Cn mentre que els complexos FK506-FKBP12 i FK506-FKBP12-Cn són essencialment iguals (Pflugl et al., 1993; Van Duyne et al., 1991).

La cristal·lització de les estructures CsA-CyPA-Cn i FK506-FKBP12-Cn ha permès identificar els residus implicats en les interaccions (Figura 5) (Griffith et al., 1995; Huai et al., 2002; Jin and Harrison, 2002; Kissinger et al., 1995). El complex CsA-CyPA interacciona amb un lloc d'unió compost que està format per la CnA i la CnB. Mentre la CsA s'uneix a la CnA, la CyPA interacciona amb la CnA i amb la CnB. Per la seva banda, el complex FK506-FKBP12 interacciona amb Cn a través del mateix lloc d'unió compost que el complex CsA-CyPA. Mentre que FK506 interacciona amb la CnA i amb la CnB, FKBP12 interacciona amb els dominis d'unió a la CnB i catalític de la CnA i amb la CnB (Ke and Huai, 2003). La unió dels complexos binaris a la Cn no canvia l'estructura general de la Cn però sí promou un

desplaçament del domini d'unió a la CnB envers les immunofilines. La comparació dels residus de Cn implicats en la interacció amb els complexos CsA-CyPA i FK506-FKBP12 ha revelat que 20 dels 25 aminoàcids implicats són comuns. Aquestes dades indiquen que ambdós complexos binaris interaccionen amb Cn a través de regions diferents però parcialment solapants (Cardenas et al., 1995).

Donat que el complex FK506-FKBP12 s'uneix al seu lloc d'unió compost i que aquest està localitzat a 25 Å del centre actiu, s'ha proposat que la inhibició de Cn és conseqüència del bloqueig espacial de l'accés dels substrats de Cn al seu centre actiu. Aquesta hipòtesi és fortament avalada pel fet de que tant CsA-CyPA com FK506-FKBP12 inhibeixen la desfosforilació del fosfopèptid RII, substrat de Cn, que té 19 aminoàcids de longitud (Swanson et al., 1992). En canvi, l'activitat fosfatasa de Cn s'incrementa de 2-3 cops respecte del substrat cromogènic pNPP (per *para-nitrophenylphosphate*), suggerint que la modulació de l'activitat de la Cn pel complexos fàrmac-immunofilina podria ser més complicada que la proposada amb el model del bloqueig espacial. L'estructura terciària CsA-CyPA-Cn revela que el residu catalític Arg122 de la CnA està a una distància corresponent a un pont d'hidrogen de la Arg148 de la CyPA. Aquest contacte probablement provoca una constricció conformacional de l'Arg122, implicant la participació directe del complex CsA-CyPA en la regulació de l'activitat fosfatasa. A més, la superposició estructural de la Cn sola o en forma de complex ternari mostra que el domini AID de la Cn interacciona i es solapa amb la CsA i el FKBP12. Això podria implicar que la unió del complex fàrmac-immunofilina afecta a la conformació del domini AID. Com a resultat, el canvi conformacional en el domini AID podria afavorir als substrats petits però no seria suficient per superar el bloqueig espacial en el cas dels substrats grans (Ke and Huai, 2003).



**Figura 5.** Estructures cristal·litzades dels complexos CsA-CyPA-Cn i FK506-FKBP12-Cn. A l'esquerra es mostra la representació dels complex CsA-CyPA-Cn: en groc, CnA; en blau clar, CnB; en verd, CsA; en vermell, CyPA; en violeta, els ions metal·lics  $Zn^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  i en blau, el  $Ca^{2+}$ . En blau es mostren els residus de Cn implicats en la interacció amb el complex CsA-CyPA. A la dreta



es mostra la representació dels complex FK506-FKBP12-Cn: en groc, CnA; en blau clar, CnB; en blau fosc, FK506; en verd, FKBP12; en rosa, els ions metàl·lics  $Zn^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  i en blau, el  $Ca^{2+}$ . En blau es mostren els residus de Cn implicats en la interacció amb FKBP12 mentre que en violeta es mostren els que interaccionen amb FK506 (*figura adaptada de Ke i Huai, 2003*).

El major efecte immunosupressor de CsA i FK506 ve donat pel potent bloqueig de la via de senyalització Cn-NFAT, la qual cosa provoca una disminució dramàtica en l'expressió de citoquines responsables de la generació de la resposta immune. En paral·lel, aquests fàrmacs també afecten parcialment però de manera indirecta l'acció d'altres factors de transcripció com AP1 i NF $\kappa$ B necessaris també pel correcte desenvolupament de l'activació limfocitària. Malauradament, donat que Cn té multitud de substrats, la inhibició promoguda per CsA i FK506 també afecta a tots els altres substrats de Cn. A més, l'establiment dels complexos fàrmac-immunofilina promou que tant CyPA com FKBP12 deixin d'exercir en part les seves funcions fisiològiques habituals. Aquests dos motius juntament amb l'administració continuada d'aquests fàrmacs als pacients, fa que tant CsA com FK506 provoquin efectes secundaris severes com nefrotoxicitat, neurotoxicitat, nefropatia crònica del trasplantament, diabetis, hipertensió i risc augmentat de patir càncer. Malgrat això, els pacients tractats amb aquests fàrmacs no desenvolupen disfuncions a nivell muscular o del sistema nerviós (Kiani et al., 2000). Alguns autors suggereixen que això pot ser degut a que l'expressió de Cn en aquests teixits és notablement superior a la del sistema immunitari o bé a que hi ha menys disponibilitat d'immunofilines en aquests teixits en comparació amb el sistema immunitari.

Per últim, afegir que aquests fàrmacs també indueixen l'expressió de TGFB (per *transforming growth factor, beta*) que és considerat el responsable principal de la nefrotoxicitat. El TGFB estimula el creixement de la matriu extracel·lular i disminueix la producció de les proteases que la degraden la qual cosa desenvolupa fibrosis intersticial tubular al ronyó (Massague, 1990). En canvi i de manera alternativa, altres dades suggereixen que el TGFB podria ser induït com a resposta al dany tissular més que ser la causa primària de la nefrotoxicitat (Halloran, 2001). Recentment, s'ha descrit que la producció de TGFB arran de l'administració de CsA pot variar segons el tipus de cèl·lula analitzada i les concentracions de CsA emprades mostrant una heterogeneïtat que els estudis inicials no havien revelat (Minguillon et al., 2005). Tot i aquestes complicacions, el TGFB també promou un efecte immunosupressor notable envers l'activació limfocitària (Kiani et al., 2000)

## 9.2. Inhibidors endògens i cel·lulars

En els darrers anys s'han caracteritzat diverses proteïnes endògenes que interaccionen amb Cn i inhibeixen la seva funció. A continuació es detallen les seves característiques.

### 9.2.1. AKAP79

Les proteïnes AKAP (per *A-kinase-anchoring proteins*) són un grup de proteïnes encarregades de localitzar la proteïna PKA en microambients específics cel·lulars mitjançant l'ancoratge a través de les seves subunitats reguladores (RI o RII) (Faux and Scott, 1996). Una d'elles, anomenada AKAP79, s'expressa especialment a neurones i també està present a cèl·lules T. En els darrers anys, la caracterització d'altres interaccions d'AKAP79 amb altres proteïnes com PKC (Faux and Scott, 1996), Cn (Coghlan et al., 1995) i amb les proteïnes PSD-95 i SAP97, ambdues proteïnes MAGUK (per *membrane-associated guanylate kinase*) (Dell'Acqua et al., 2006), ha fet que AKAP79 s'hagi considerat una proteïna adaptadora capaç d'establir grans complexos multiproteïcs.

Pel que fa a la interacció amb Cn, inicialment es va realitzar un mapatge de les regions tant de Cn com d'AKAP79 implicades en l'establiment de la unió (Kashishian et al., 1998). Mitjançant assaigs de doble híbrid es va determinar que els residus 30-336 de CnA són importants i que no es requereix la participació de la CnB. Pel que fa a AKAP79, inicialment va semblar que els aminoàcids necessaris eren del 108-280 i especialment del 236-280. Aquesta interacció entre ambdues proteïnes es va determinar *in vitro* i *in vivo*.

A més, AKAP79 també inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn *in vitro* envers el fosfopèptid RII i *in vivo* envers els NFAT, a més d'inhibir la transcripció de la proteïna luciferasa quan aquesta es troba sota el control d'un promotor dependent de NFAT (Kashishian et al., 1998). Aquest efecte inhibidor també es va demostrar emprant un model murí transgènic que expressa la regió d'AKAP79 (residus 60-358), que inclou el domini inhibidor de Cn, específicament al cor (De Windt et al., 2001). Aquests ratolins van mostrar una disminució significativa de l'activitat fosfatasa de Cn, així com una hipertròfia reduïda davant d'estímuls hipertròfics com són l'administració de catecolamines o la sobrecàrrega de pressió (De Windt et al., 2001).

Posteriorment, un altre treball va mostrar que els aminoàcids 315-360 d'AKAP79 són necessaris i suficients per interaccionar i inhibir Cn (Dell'Acqua et al., 2002). A més, a partir d'aquesta regió de 45 aminoàcids es van dissenyar tres pèptids amb les seqüències solapants i tots tres continuaven essent capaços d'unir i inhibir Cn indicant que AKAP79 conté diversos motius d'interacció amb Cn i determinants inhibidors de la seva activitat fosfatasa. Finalment, també van demostrar que un d'aquests pèptids, el que inclou els aminoàcids 330-357, pot bloquejar *in vitro* la co-immunoprecipitació AKAP79-Cn, i també inhibeix la interacció AKAP79-Cn *in vivo*. L'anàlisi de la seqüència d'aquest pèptid va mostrar que contenia la seqüència PIAIIT, que és similar al motiu consens PxlIT dels NFAT, i que comprèn els residus 337-343 (Dell'Acqua et al., 2002). Molt recentment, estudis emprant una construcció que correspon a la proteïna AKAP79 sencera a la qual se li ha deletat la seqüència PIAIIT, han mostrat que aquesta proteïna és incapaç d'interaccionar amb Cn i per tant de localitzar Cn a la membrana (Oliveria et al., 2007).



Per altra banda, estudis realitzats emprant deleccions de la CnA han permès acotar la regió de CnA amb la qual interacciona AKAP79 (Rodriguez et al., 2005). Inicialment es va descriure que aquesta incloïa els aminoàcids 30-336 de CnA (Kashishian et al., 1998) però actualment s'ha suggerit que els 13 aminoàcids del *linker* de CnA que van dels aminoàcids 335-347 podrien ser essencial en la interacció (Rodriguez et al., 2005). A més l'utilització de mutants puntuals, dobles i triples d'alguns residus inclosos dins el *linker* de CnA han permès determinar que aquests són crítics en la interacció amb AKAP79 essent la substitució L343S l'única que no afecta a la interacció AKAP79-CnA (Rodriguez et al., 2005).

### 9.2.2. Cabin1/Cain

Mitjançant un assaig de doble híbrid a llevat emprant una llibreria de cDNA de cèl·lules T d'origen murí es va identificar Cabin1 (per *calcineurin binding protein*) com una proteïna que interacciona amb Cn (Sun et al., 1998). De manera independent i simultània es va identificar Cain (per *calcineurin inhibitor*), una altra proteïna que s'uneix a Cn, i que va resultar ser l'ortòleg de Cabin1 a rata (Lai et al., 1998).

Aquesta proteïna té 2220 aminoàcids i es localitza a nucli. La seva interacció amb Cn depèn de  $Ca^{2+}$  i de PKC, perquè s'estableix entre la Cn quan està activada i Cabin1/Cain quan està hiperfosforilada per PKC. Així mateix la interacció amb Cn l'estableix a través d'una regió de 38 aminoàcids localitzada en el seu extrem C-terminal. Aquesta regió conté la seqüència PEITVT que s'assembla al motiu consens PxlxIT dels NFAT. A més, Cabin1/Cain és un inhibidor no competitiu *in vitro* responsable d'inhibir *in vivo* tant la desfosforilació dels NFAT com la transcripció del gen de la luciferasa quan aquest es troba sota el control del promotor de la *IL2* (Lai et al., 1998; Sun et al., 1998).

La funció inhibidora de Cabin1 envers l'activitat fosfatasa de Cn també s'ha estudiat emprant models murins. De Windt i col. van generar un ratolí transgènic que expressava un fragment de Cabin1 que inclou el domini inhibidor de Cn (residus 1989-2182) sota el control del promotor de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina, específica de cor (De Windt et al., 2001). Aquests ratolins van mostrar una activitat de Cn notablement disminuïda, així com una reducció significativa de la hipertròfia cardíaca i una disminució de l'expressió de gens marcadors d'aquesta, com el factor natriurètic atrial. Per altra banda, Esau i col. van generar un ratolí que tenia deleccionat un fragment de Cabin1 que conté el domini d'unió a Cn així com el d'unió al factor de transcripció MEF2 (Esau et al., 2001). Aquests ratolins van mostrar un increment en l'expressió de citoquines, *IL2*, *IL4*, *IL9*, *IL13* i *IFNG* que no correlacionava amb un increment en la translocació nuclear de NFAT, sinó que semblava que era dependent de la transcripció regulada per MEF2 (Esau et al., 2001). Posteriorment, s'ha descrit àmpliament el paper de Cabin1 com a repressor de la transcripció dependent de MEF2. MEF2, està associat constitutivament als llocs d'unió dels promotors dels gens que regula, entre ells *Nur77* i *IL2* (Pan et al., 2004; Youn and Liu, 2000). Quan les cèl·lules no estan activades, MEF2 interacciona amb diverses proteïnes encarregades de reprimir la transcripció d'aquests

gens, entre elles Cabin1, el corepressor mSin3 i diverses histona deacetilases (HDACs). Però quan es produeix un increment en la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$ , diversos mecanismes alliberen Cabin1 i les altres proteïnes, permetent que MEF2 recluti la histona acetilasa (HAT) p300 i estimuli la transcripció dependent de MEF2 (Youn and Liu, 2000). Un d'aquests mecanismes proposa que la CaM activada pel  $Ca^{2+}$  s'uneix a Cabin1 i provoca així el seu alliberament del complex repressor (Youn et al., 1999). Un segon model proposa que la quinasa dependent de  $Ca^{2+}$ /CaM IV (CaMKIV) fosforila diversos residus de Cabin1 creant un lloc d'unió per la proteïna 14-3-3 que serà l'encarregada d'exportar a Cabin1 del nucli al citoplasma (Pan et al., 2005).

Molt recentment, s'ha descrit que Cabin1 interacciona amb Cn, a més de amb el domini del C-terminal (residus 2117-2161) a través d'un segon domini localitzat a l'extrem N-terminal (residus 701-900) (Jang et al., 2007), i ho fa de manera independent. A més, mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació, s'han identificat les dues regions de CnA $\beta$  que interaccionen amb aquestes dues seqüències de Cabin1: són els aminoàcids 329-401 de CnA $\beta$ , pel domini de l'extrem C-terminal de Cabin1 i els aminoàcids 1-97 de CnA $\beta$ , pel domini del N-terminal de Cabin1. Els dos motius de Cabin1 inhibeixen l'activitat de Cn *in vitro* envers el fosfopèptid RII i *in vivo* envers la desfosforilació, translocació i transcripció dependent de NFAT, però el motiu que comprèn els residus 701-900 interacciona amb l'extrem N-terminal. Aquest fet ha portat als autors del treball a suggerir que la regió 701-900 de Cabin1 tindria un efecte al·lostèric vers Cn i podria considerar-se com un inhibidor no competitiu (Jang et al., 2007).

### 9.2.3. A238L

El virus ASFV (per *African swine fever virus*) és un virus de DNA que replica de manera primària en macròfags *in vivo* i que provoca febres hemorràgiques agudes en porcs domèstics i infeccions asimptomàtiques en els seus hostes naturals (Miskin et al., 1998). Aquest virus expressa proteïnes encarregades d'interferir amb el sistema immunitari de l'hoste amb la finalitat d'escapar d'ell. Una d'aquestes proteïnes és la proteïna A238L, la qual conserva bastant similitud amb la família de proteïnes I $\kappa$ B. Mitjançant un assaig de doble híbrid es va caracteritzar la interacció d'A238L amb Cn. La interacció A238L-Cn no és competida amb CsA, la qual cosa indica que A238L i el fàrmac no comparteixen el mateix lloc d'unió a Cn. A més, altres experiments van mostrar que A238L inhibeix *in vivo* la seva activitat fosfatasa. Això s'ha analitzat determinant l'expressió del gen de la luciferasa sota el control de promotors regulats per NFAT, AP1 o NF $\kappa$ B. Els resultats han mostrat que mentre que A238L inhibeix l'expressió dependent de NFAT i també de NF $\kappa$ B, no provoca cap efecte envers la d'AP1. Així doncs, la proteïna A238L sembla tenir dues funcions: unir-se a Cn i inhibir la seva activitat fosfatasa i a la vegada inhibir la transcripció dependent de NFAT i de NF $\kappa$ B (Miskin et al., 1998).

Pel que fa a la funció envers Cn, s'ha determinat que la regió mínima d'interacció d'A238L amb Cn correspon a un motiu de 14 aminoàcids localitzat al seu extrem C-terminal (aminoàcids 200-213). La seqüència consens d'aquest motiu PxlITxC/S, és similar al motiu PxlIT d'ancoratge dels NFAT a Cn, i està conservada en diferents proteïnes A238L de diferents virus ASFV aïllats. Pel que fa a la CnA, la regió mínima que participa en la interacció amb A238L comprèn els aminoàcids 32-350 i correspon majoritàriament al domini catalític de la CnA $\beta$  (Miskin et al., 2000).

Mitjançant assaigs de competició de la interacció A238L-Cn amb pèptids que contenen la seqüència consens mínima d'interacció de NFAT o de A238L, s'ha pogut determinar que ambdós pèptids competeixen la interacció analitzada. Aquests resultats, juntament amb la gran similitud de seqüència compartida pels dos motius, indiquen que probablement A238L i NFAT interaccionen amb Cn a través de la mateixa regió o en regions properes. De manera similar al motiu PxlIT dels NFAT que interacciona amb Cn però no inhibeix Cn, el motiu d'A238L tampoc inhibeix *in vitro* l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII (Miskin et al., 2000).

Molt recentment s'ha descrit que la regió mínima inhibidora d'A238L està localitzada al seu extrem C-terminal i conté 82 aminoàcids (Abraham et al., unpublished results).

Per altra banda, també s'ha descrit que existeixen dues isoformes d'A238L: una de 28 kDa i una altra de 32 kDa. Mentre que la de 32 kDa es localitza preferentment al nucli, tant la de 28 com la de 32 kDa poden ser detectades al citoplasma (Silk et al., 2007). A més, mentre que alguns autors han mostrat que A238L co-precipita amb p65 (Revilla et al., 1998) altres han vist que la isoforma de 28 kDa no és la responsable d'aquesta co-precipitació. Aquestes dades suggereixen, que la isoforma de 28 kDa d'A238L podria ser la isoforma implicada en la unió i inhibició de Cn (Tait et al., 2000).

#### 9.2.4. CHP

La CHP (per *calcineurin B homologous protein*) va ser identificada inicialment mitjançant un assaig de doble híbrid com una proteïna que era capaç d'interaccionar amb NHE1, que és una de les nou isoformes de proteïnes intercanviadores de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> que es coneixen (Lin et al., 1999). Donada l'alta homologia amb la CnB i la CaM inicialment es va predir que podria interaccionar amb CnA.

Mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació *in vivo* s'ha determinat que la CHP interacciona amb CnA. A més, la CHP inhibeix *in vitro* l'activitat fosfatasa de la Cn envers el fosfopèptid RII probablement perquè altera l'associació de l'heterotrímer format per CnA, CnB i CaM. *In vivo*, CHP inhibeix la transcripció del gen de la luciferasa sota el control d'un promotor dependent de NFAT però no d'AP1. Així mateix, també inhibeix però només un 25%, l'expressió dependent de NF $\kappa$ B. En concordança amb aquests resultats, CHP inhibeix la translocació nuclear de NFAT. Per últim, també s'ha vist que l'activació prolongada de

cèl·lules Jurkat via TCR disminueix els nivells de proteïna de CHP però no els de mRNA suggerint un mecanisme de regulació fisiològica a nivell post-traducciona (Lin et al., 1999).

### 9.2.5. CALSARCINA-1

La família de les Calsarcines és una família de proteïnes que interaccionen amb Cn i que s'expressen exclusivament a múscul estriat (Frey et al., 2000b). Està formada per tres membres: CALSARCINA-1, 2 i 3. CALSARCINA-1 és l'únic membre que s'expressa a cor adult i a les fibres lentes del múscul esquelètic mentre que en canvi, CALSARCINA-2 i 3 s'expressen a les fibres ràpides (Frey and Olson, 2002). La seva funció inhibidora envers l'activitat fosfatasa de Cn s'ha caracteritzat emprant un model murí deficient en Calsarcina-1 (Frey et al., 2004). En múscul esquelètic, els ratolins *Calsarcina-1<sup>-/-</sup>* mostren un major nombre de fibres lentes i una major activitat fosfatasa. A cor, aquests ratolins, tot i no presentar hipertròfia cardíaca, sí que tenen una major associació Cn-CaM així com NFAT-DNA i els nivells d'expressió de diversos marcadors hipertròfics augmentats (Frey et al., 2004). A més, el creuament de ratolins *Calsarcina-1<sup>-/-</sup>* amb ratolins transgènics que expressen la CnA\*, promou l'aparició d'un fenotip cardíac hipertròfic més exagerat que el que presenten els ratolins que solament són transgènics de CnA\*, i com a conseqüència els provoca la mort prematura.

En canvi, quan als ratolins únicament deficients en Calsarcina-1 se'ls administra isoproterenol o són sotmesos a exercici perllongat, el tamany del seu cor no augmenta ni tampoc l'expressió gènica de marcadors hipertròfics (Frey et al., 2004).

Així doncs, CALSARCINA-1 semblaria que no participa en la regulació de l'hipertròfia fisiològica però sí en la hipertròfia provocada per altres tipus d'estímuls a través de la inhibició de l'activitat fosfatasa de Cn.

### 9.2.6. FKBP38

La proteïna FKBP38 és un membre de la família de proteïnes FKBP (per *FK506-binding proteins*) que està localitzat a la mitocondria (Shirane and Nakayama, 2003). L'any 2002, Shirane i col. van demostrar que FKBP38 és un inhibidor endogen de Cn i que a més pot tenir funcions anti-apoptòtiques donat que és el responsable d'ancorar Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> a la membrana de la mitocondria (Shirane and Nakayama, 2003). Aquests autors mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació amb proteïnes sobreexpressades o a nivell endogen van mostrar que Cn interacciona amb FKBP38, tant en presència com en absència de FK506. A més, també demostren que FKBP38 inhibeix tant *in vitro* com *in vivo* l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII i la translocació nuclear de NFAT (Shirane and Nakayama, 2003).

Contràriament, Weiwad i col. han qüestionat que FKBP38 sigui un inhibidor de Cn (Weiwad et al., 2005). Mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació mostren que la proteïna FKBP38 no interacciona amb Cn però sí ho fa amb CaM. *In vitro* s'ha vist que FKBP38 inhibeix de manera poc potent l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII, i només quan

FKBP38 s'afegeix a altes concentracions i CaM a baixes. *In vivo*, FKBP38 tampoc és capaç d'inhibir l'expressió del gen de la luciferasa sota control d'un promotor dependent de NFAT, ni sola ni en presència d'un lligand de la immunofilina.

FKBP38 inclou un domini FKBP, però els residus crucials per interaccionar amb FK506 així com els de l'activitat peptidil prolil *cis-trans* isomerasa (PPIasa) sembla que no estan conservats (Lam et al., 1995). Malgrat això, recentment s'ha demostrat que FKBP38 té activitat PPIasa (Edlich et al., 2005; Kang et al., 2005a) però en canvi, és incapaç d'unir-se a FK506 (Kang et al., 2005a). A més, aquest treball torna a mostrar que *in vitro* FKBP38 sola o en presència de FK506 no inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn (Kang et al., 2005a).

A més dels resultats oposats obtinguts pel que fa a la funció inhibidora de FKBP38 envers l'activitat fosfatasa de Cn respecte RII també s'han publicat resultats oposats pel que fa a la seva capacitat anti o pro-apoptòtica (Edlich et al., 2005; Shirane and Nakayama, 2003; Wang et al., 2005).

### 9.2.7. CARABIN

Aquest és el darrer inhibidor endogen de Cn identificat fins al moment. CARABIN és una proteïna de 466 aminoàcids que s'expressa a humans i a ratolins i que comparteix un 88% d'identitat de seqüència entre ambdues espècies (Pan et al., 2007).

CARABIN conté al seu extrem N-terminal un domini Ras/Rab GAP (aminoàcids 89-294) i en el seu extrem C-terminal un domini a través del qual interacciona amb Cn (aminoàcids 406-446). CARABIN interacciona *in vitro* i *in vivo* amb Cn, inhibeix la seva activitat fosfatasa envers RII, inhibeix la desfosforilació i translocació nuclear de NFAT i com a conseqüència, l'expressió d'*IL2*. En paral·lel, CARABIN té activitat Ras GTP *in vitro* i *in vivo* i inhibeix específicament l'estat de fosforilació de ERK1/ERK2 però no de p38 o JNK. A més, l'expressió de CARABIN és mediada a través de Cn suggerint l'existència d'un cicle de retroalimentació negativa. Tots aquests resultats indiquen que, CARABIN connecta la via de senyalització de Cn amb la de RAS i això podria ser important en la inhibició de la senyalització via TCR i de l'activació limfocitària (Pan et al., 2007).

### 9.2.8. Proteïnes RCAN

Les proteïnes DSCR1 (per *Down Syndrome candidate region-1*) formen una família de proteïnes que interaccionen i regulen l'activitat de Cn. Els membres d'aquesta família, als quals també se'ls ha anomenat Calcipressines o MCIPs (per *modulatory calcineurin interacting proteins*), han patit recentment un canvi de nom per permetre la unificació de la nomenclatura i han passat a anomenar-se RCAN (per *regulators of calcineurin*) (Davies et al., 2007).

Donada la seva importància en la realització d'aquest treball experimental, s'explicaran en detall més endavant a l'apartat 11.

### 9.3. Pèptids inhibidors

Diversos treballs han proposat l'ús de pèptids, entre ells els que contenen les seqüències d'unió de NFAT amb Cn, com a possibles bloquejadors de la interacció NFAT-Cn. Aquesta interferència, en alguns casos, tindria lloc sense afectar a l'activitat fosfatasa de Cn, seria més específica i donaria lloc a menys efectes secundaris que l'ús de CsA i FK506.

#### 9.3.1. SPRIEIT i VIVIT

L'any 1996, Luo i col. van descriure que la regió N-terminal de NFATc2 (aminoàcids 1-415) contenia un domini regulador a través del qual NFATc2 s'unia directament a Cn, era substrat *in vitro* de Cn i era responsable de la seva localització subcel·lular (Luo et al., 1996). Amb la finalitat d'identificar la seqüència o seqüències responsables d'ancorar els NFAT a Cn es van realitzar diversos mutants que contenien de 1 a 5 substitucions a alanina en 58 posicions conservades del domini regulador caracteritzat (Aramburu et al., 1998). Aquest treball va permetre caracteritzar una regió que inhibia *in vitro* la desfosforilació dels NFAT i que incloïa el motiu consens PxlIT, que està conservat en les proteïnes NFAT. Pèptids sintètics de 26 aminoàcids o 13 aminoàcids de longitud que contenien aquesta seqüència consens eren capaços d'inhibir la interacció NFAT-Cn. Una característica prometedora d'aquests pèptids era que eviten la desfosforilació de NFAT, però en canvi no bloquegen l'activitat fosfatasa de Cn envers altres substrats com RII o la proteïna TAU, suggerint que la interacció amb Cn no tindria lloc a través del centre actiu. *In vivo* es va confirmar que aquests pèptids podien inhibir la desfosforilació, la translocació i la transcripció dependent de NFAT, demostrant que podien interaccionar amb Cn independentment del seu estat d'activació. A aquests dos pèptids se'ls va anomenar SPRIEIT i les seves seqüències són: SPRIEIT-25: KPAGASGSPRIEITPSHELMQAGGY i SPRIEIT-13: SGPSPRIEITPSH. Els mateixos autors van demostrar que *in vitro* les proteïnes NFAT interaccionen de manera més eficaç amb la Cn activada que amb la no activada suggerint que, a més del motiu SPRIEIT, podria haver alguna altra regió als NFAT a través de la qual interaccionessin amb Cn (Garcia-Cozar et al., 1998). Amb la finalitat de caracteritzar el lloc d'unió a CnA d'aquestes dues regions de NFAT, es va emprar un mutant de la CnA que únicament incloïa el domini catalític, la construcció CnA $\alpha$ (1-347). La interacció NFAT-CnA $\alpha$ (1-347) podia ser competida de manera parcial pel complex CsA-CyPA, així com pels pèptids RII i AID, que es sap que interaccionen amb Cn a través del seu centre actiu i a més també podia ser competida pel pèptid sintètic SPRIEIT-25, que es sabia que ho fa a través d'alguna regió situada fora del centre actiu. Aquests resultats van mostrar que NFAT interaccionava amb Cn a través de dos motius, un encara no identificat i el motiu SPRIEIT, i que a més, la interacció del primer tenia lloc a través del centre actiu de CnA mentre que el SPRIEIT s'uniria a través d'alguna regió diferent del centre actiu. Aquestes dades van portar als autors a suggerir que en cèl·lules no estimulades, els NFAT estarien units a CnA a través d'alguna regió situada fora del seu centre actiu. En canvi, l'estimulació de les



cèl·lules per un senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  provocaria el desplaçament del domini AID permetent que els NFAT s'unissin addicionalment a CnA a través del seu centre actiu. Això afavoriria el posicionament adequat dels NFAT i la desfosforilació immediata per part de Cn dels residus serina de NFAT fosforilats (Garcia-Cozar et al., 1998).

Els assaigs d'interacció *in vitro* van permetre determinar que la  $\text{IC}_{50}$  de SPRIEIT-25 era de  $\sim 15 \mu\text{M}$  respecte les interaccions de NFATc1, NFATc2 i NFATc3 amb Cn (Aramburu et al., 1998). Amb l'objectiu d'obtenir inhibidors de la interacció NFAT-Cn que fossin més potents que el pèptid SPRIEIT es van sintetitzar dues quimiotèques combinatòries de pèptids basades en el motiu consens PxlIT dels NFAT. La primera tenia la seqüència  $\text{MAxxxPxlITxxlIKK}$ , on la x representa una barreja d'aminoàcids naturals, i els pèptids van ser seleccionats en funció de la seva capacitat d'unir-se a una proteïna de fusió que contenia el domini catalític de la CnA unit a la glutatió S-transferasa (GST). Per acabar de refinar els pèptids seleccionats a partir del primer cribratge es va emprar una segona quimioteca de pèptids degenerats basats en la seqüència  $\text{MAGxIIP[T/x][z/x]xlxGPIIEE}$ , on la z representa una sèrie de residus no naturals. Aquesta quimioteca tenia algunes posicions fixades a partir dels resultats obtinguts amb el primer cribratge així com algunes posicions no fixades que havien estat fixades a la primera quimioteca. Aquest treball va permetre seleccionar un pèptid de 16 aminoàcids que es va anomenar VIVIT la seqüència del qual és:  $\text{MAGPHPVIVITGPHEE}$  (Aramburu et al., 1999). El pèptid VIVIT és 25 cops més afí per Cn que el pèptid SPRIEIT natural i a l'igual que ell competeix *in vitro* la interacció NFAT-Cn i tant la desfosforilació com la transcripció dependent de NFAT. A més, no inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn i inhibeix selectivament la transcripció dependent de NFAT mentre que la de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , no. A més, aquest pèptid és responsable de la disminució de la transcripció de diverses citoquines dependents de NFAT com *CSF2*, *TNF* i *IL2*, entre d'altres, en cèl·lules Jurkat. En canvi, no inhibeix la transcripció de *LTA* (per *lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)*) ni *LTB* (per *lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)*), l'expressió de les quals es considera sensible a CsA, presumiblement dependent de Cn, i independent dels NFAT (Aramburu et al., 1999).

En els darrers anys, han aparegut diversos treballs avalant l'eficàcia inhibidora *in vivo* del pèptid VIVIT en ratolins o rates. La majoria d'ells, utilitzen el pèptid VIVIT sintetitzat juntament amb 11 arginines localitzades al seu extrem N-terminal que funcionen com un domini de transducció proteica. S'ha demostrat que les seqüències de poliarginines (de 6 a 11) faciliten l'entrada de pèptids bioactius i proteïnes en cèl·lules eucariotes *in vitro* i *in vivo* (Futaki et al., 2001). Així doncs, s'ha demostrat que el pèptid 11R-VIVIT afavoreix la supervivència de l'al·loinjert en un trasplantament d'illots pancreàtics sense comprometre la secreció d'insulina (Noguchi et al., 2004); disminueix la hipertròfia cardíaca en models de rata amb l'aorta lligada (Kuriyama et al., 2006); inhibeix els processos proliferatius i inflamatoris que causen vasculopatia obstructiva en models d'hipertensió pulmonar arterial (Bonnet et al., 2007). A més, també s'ha demostrat que el VIVIT, en forma de proteïna de fusió a EGFP (per *enhanced green fluorescent protein*) o sense les arginines, podria ser un nou

agent antirestenòtic emprant models de rates o línies cel·lulars endotelials, respectivament (Liu et al., 2005; Yu et al., 2006).

Donat el potencial terapèutic del pèptid VIVIT, en els darrers anys s'han realitzat estudis estructurals de la interacció VIVIT-Cn. Al 2004, Li i col. mitjançant diferents tècniques (entrecruament del VIVIT amb Cn, predicció de llocs d'unió *in silico* i assaigs experimentals amb mutants de Cn) van descriure que el pèptid VIVIT (5-mer) interacciona amb el full  $\beta$  número 14 de la CnA $\alpha$  i que la Thr del motiu consens PxlIT interacciona amb el residu N330 de la CnA $\alpha$  (Li et al., 2004). Molt recentment, i de manera simultània han aparegut dos treballs on caracteritzen aquesta interacció amb tècniques més resolutives, cristal·lització de raigs X i ressonància magnètica nuclear (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007). En ambdós casos, demostren que el pèptid VIVIT (14-mer) forma un full  $\beta$  paral·lel amb el full  $\beta$  exposat número 14 de la CnA. A més, tots dos descriuen regions similars de CnA responsables de la interacció amb el pèptid VIVIT, essent en un cas els aminoàcids 327-333 i en l'altre els aminoàcids 329-332 de la CnA $\alpha$ , ambdues regions situades fora del *linker* de CnA. Pel que fa al VIVIT, ambdós treballs afirmen que els residus conservats en la seqüència consens PxlIT són crucials en la interacció. Per últim, l'orientació del pèptid VIVIT en la interacció amb Cn afavoriria que els residus fosforilats de NFAT estiguessin localitzats a prop del centre actiu (Takeuchi et al., 2007).

### 9.3.2. LxVP

Tal i com s'ha comentat a l'apartat anterior, el treball de García-Cozar i col. va descriure l'existència d'un segon lloc d'unió de NFAT en CnA (Garcia-Cozar et al., 1998). Mitjançant mutants de NFAT es van poder identificar les dues regions: una que contenia la seqüència PxlIT localitzada a l'extrem N-terminal del NHR (anomenada també CNBR1) i una segona que contenia la seqüència LxVP localitzada al C-terminal del NHR (anomenada també CNBR2) (Liu et al., 1999; Park et al., 2000). L'anàlisi posterior del domini LxVP va permetre acotar el lloc d'unió a una seqüència de 16 aminoàcids anomenada Pep3 responsable d'inhibir la translocació de NFATc3 de manera específica mentre que la de NFATc2, no (Liu et al., 2001). A més, el domini LxVP està conservat només parcialment entre els diferents membres de la família NFAT i sembla que això confereix certa selectivitat a la interacció de Cn amb determinats membres de la família. Recentment, s'ha realitzat una anàlisi comparativa de l'afinitat dels motius PxlIT i LxVP dels diferents NFAT (Martinez-Martinez et al., 2006). Mitjançant assaigs *pull down*, els autors han demostrat que *in vitro* NFATc1 s'uneix de manera més afí a Cn que no pas NFATc2. Aquesta diferència no sembla que sigui causada pels motius PxlIT, perquè ambdós interaccionen amb Cn amb afinitats semblants, tot i que PxlITc2 s'uneix de manera una mica més afí que no PxlITc1. Així doncs, la diferent capacitat d'unió dels dos NFAT sembla que està directament relacionada amb la diferent afinitat dels LxVP per Cn: mentre que LxVPc1 s'uneix de manera molt afí a Cn, el LxVPc2 no s'uneix. De fet, el motiu LxVPc1 és també més afí per Cn que no pas PxlITc1 o PxlITc2. A més, LxVPc1 inhibeix



l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII mentre que el PxlITc2, no, i també inhibeix tant la desfosforilació com la translocació nuclear de NFATc2 (Martinez-Martinez et al., 2006).

### 9.3.3. Pèptids de Cn: el domini AID i la regió *linker* de Cn

Dues regions de Cn, el domini AID i el *linker*, també s'ha demostrat que poden inhibir la via de senyalització Cn-NFAT.

L'any 1990, Hashimoto i col. van descriure que la regió 457-481 de CnA constituïa un domini autoinhibidor de l'activitat fosfatasa de l'enzim. Aquest motiu de 25 aminoàcids inhibia potentment i de manera específica l'activitat fosfatasa de Cn envers la cadena lleugera de la miosina marcada amb  $^{32}\text{P}$  i el substrat pNPP mentre que no afectava a altres tipus de fosfatasas (Hashimoto et al., 1990). Malauradament, la interacció d'aquest motiu a través del centre actiu de CnA, bloquejaria la desfosforilació per part de Cn de tots els seus substrats. Aquest fet, convertiria al pèptid AID en un candidat a immunosupressor poc adient. Tot i així, el fet de no requerir immunofilines per inhibir a Cn, podria significar un increment en l'especificitat de substrat respecte els fàrmacs inhibidors de Cn actuals, CsA i FK506.

Per altra banda, la generació de mutants puntuals en l'ortòleg de Cn a llevat va permetre identificar tres residus localitzats a la regió *linker* de Cn crucials per a l'activitat fosfatasa (Jiang and Cyert, 1999). Les substitucions S373P, H375L i L379S de la regió *linker* de Cn inhibeixen l'activitat fosfatasa de Cn *in vitro* i *in vivo*. Recentment, un treball ha mostrat que la substitució dels 3 aminoàcids caracteritzats en llevat en la CnA $\alpha$  humana, corresponents a les posicions S337P H339L L343S, en forma de mutants senzills, dobles i triples, inhibeixen la interacció de CnA $\alpha$  amb el NFATc2 i la seva translocació a nucli (Rodríguez et al., 2005). A més, també afecten a la interacció de Cn amb dues proteïnes, Cabin1 i AKAP79, que contenen seqüències semblants al motiu consens PxlIT dels NFAT (Rodríguez et al., 2005). De manera interessant s'ha descrit que la substitució L343S disrupta específicament la interacció NFATc2-Cn però no la corresponent amb Cabin1 o AKAP79. Els autors suggereixen que l'utilització de la regió *linker* de Cn enlloc del motiu PxlIT permetria identificar inhibidors més específics.

Aquests resultats no coincideixen exactament amb els obtinguts recentment a partir de les anàlisi estructurals de la interacció VIVIT-Cn, perquè mentre que aquests autors afirmen que la regió *linker* es crucial en l'establiment de la interacció NFATc2-Cn (Rodríguez et al., 2005), altres demostren que aquesta té lloc a través d'una regió localitzada fora del *linker* de CnA, tot i que situada adjacent al seu extrem N-terminal (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007).

#### 9.4. Molècules inhibidores

Durant els darrers anys, s'han identificat diverses molècules sintètiques i naturals inhibidores de Cn. Entre els inhibidors sintètics, el PD 144795 és un derivat del benzotiofè que originalment va ser descrit com anti-inflamatori i que també bloqueja l'activitat de Cn en extractes cel·lulars (Gualberto et al., 1998). Entre els naturals, el ciclolinopèptid A (CLA) i altres pèptids cíclics naturals constitueixen una família de pèptids immunosupressors que inhibeixen a Cn mitjançant un mecanisme similar a la CsA, però de manera notablement menys potent (Gaymes et al., 1997). A més, també s'han desenvolupat anàlegs de CsA i FK506. La molècula ISA(TX)247 mostra més potencial immunosupressor i menys toxicitat renal que la CsA (Aspeslet et al., 2001), mentre que L-732,531 promou un efecte immunosupressor similar a FK506 però amb menys nefrotoxicitat (Dumont, 2000).

Recentment, l'ampli ús de tècniques de cribratge d'alta eficàcia (*high throughput screening*, HTS) ha permès caracteritzar molècules inhibidores de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT a diferents nivells: inhibició del senyal de  $Ca^{2+}$ , de la interacció NFAT-Cn i de la unió cooperativa NFAT:AP1 amb el DNA. En aquest apartat únicament es descriuran algunes molècules disruptores de la interacció NFAT-Cn.

L'any 2004, Roehrl i col. van identificar i caracteritzar un conjunt de compostos anomenats INCA (per *inhibitors of NFAT-calcineurin association*) responsables d'interaccionar directament amb Cn i desplaçar la interacció VIVIT-Cn *in vitro* (Roehrl et al., 2004). D'entre ells, l'INCA-6 inhibeix la desfosforilació, la translocació i la transcripció de diverses citoquines dependents de NFAT sense afectar a l'activitat fosfatasa de la Cn. Malauradament, a cèl·lules de melsa, la citotoxicitat que promouen és molt significativa apareixent el fenomen apoptòtic característic del *blebbing* a les 2-4 hores d'incubació. Per aquesta raó, els assaigs *in vivo* únicament es van poder dur a terme en la línia cel·lular Cl.7W2 de limfòcits T, que va tolerar l'ús d'INCA-6 a concentracions dins del rang micromolar (Roehrl et al., 2004). Posteriorment, el mateix grup va demostrar que el lloc d'interacció dels INCA-1, INCA-2 i INCA-6 està centrat en la cisteïna 266 de la  $Cn\alpha$  amb la qual estableixen un enllaç covalent (Kang et al., 2005b). A l'igual que l'INCA-6, l'INCA-2 inhibeix *in vivo* en cèl·lules T D5 la via de senyalització Cn-NFAT però a diferència d'ell inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn. La unió dels INCA amb Cn probablement promou un canvi conformacional en el *loop* de la  $Cn\alpha$  a través del qual s'ha descrit que el pèptid VIVIT interacciona amb la Cn (Li et al., 2004). Així doncs, els autors suggereixen que els INCA no disrupten la interacció VIVIT-Cn de manera directa sinó que s'uneixen a través d'un lloc proper al lloc d'unió del PxlIT i això provoca un canvi al·lostèric que fa que el pèptid VIVIT no pugui unir-se a Cn (Kang et al., 2005b).

Molt recentment, emprant una quimioteca de composts heterocíclics sintetitzats químicament s'ha identificat la pirazolpirimidina (anomenada NCI1) com una molècula capaç d'inhibir *in vitro* l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII (Sieber et al., 2007). El disseny de derivats de la seva estructura ha permès identificar una molècula anomenada NCI3 (per *NFAT-calcineurin-signaling inhibitor 3*) capaç d'inhibir la desfosforilació, translocació i

transcripció dependent de NFAT. A diferència de NCI1, el producte NCI3 no inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn envers el fosfopèptid RII i només ho fa en un 10-20% vers el substrat pNPP. A més, NCI3 competeix només parcialment la interacció VIVIT-Cn, la qual cosa també ha portat als autors a suggerir un possible efecte al·lostèric de NCI3 envers la interacció PxlXIT-Cn (Sieber et al., 2007).

## 10. LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES RCAN

Aquesta família de proteïnes està present des de llevats a humans i es caracteritza per tenir el motiu anomenat FLISPP, considerat com la senya d'identitat de la família (Hilioti and Cunningham, 2003). En humans existeixen tres membres: RCAN1, RCAN2 i RCAN3.

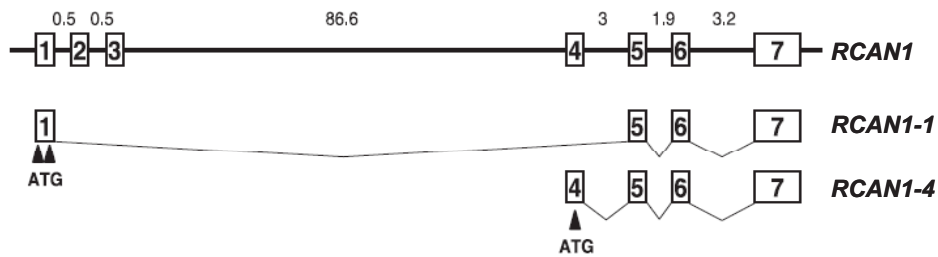
### 10.1. Regulador de la calcineurina 1, RCAN1

El gen humà *RCAN1*, també anomenat *DSCR1* (per *Down Syndrome candidate region 1*), *ADAPT78* o *MCIP1*, va ser identificat l'any 1995 (Fuentes et al., 1995) com a part d'un projecte que pretenia identificar nous gens al cromosoma 21 humà, la trisomia parcial o total del qual està present en els malalts amb Síndrome de Down. Posteriorment, va ser clonat el gen *Rcan1* de ratolí (Casas et al., 2001).

#### 10.1.1. Estructura gènica i patró d'expressió de *RCAN1*

El gen humà *RCAN1* està localitzat al cromosoma 21, 21q22.12, i està format per 7 exons. Mitjançant *splicing* alternatiu *RCAN1* pot donar lloc a quatre transcrits diferents: *RCAN1-1*, *RCAN1-2*, *RCAN1-3* i *RCAN1-4*, que tenen en comú els exons 5, 6 i 7 i utilitzen els exons 1, 2, 3 i 4, com a primers exons de manera alternativa i excloent. Dels quatre transcrits, els més abundants són *RCAN1-1* i *RCAN1-4*. El transcrit *RCAN1-2* s'ha detectat per RT-PCR a cervell i fetge fetal, mentre que el transcrit *RCAN1-3*, no s'ha detectat fins al moment (Fuentes et al., 1997) (Figura 6).

Els dos transcrits més abundants, *RCAN1-1* i *RCAN 1-4*, donen lloc a un mRNA amb una mida estimada de 2.2 kb, tant en teixits humans adults i fetals. Mitjançant transferència de *Northern*, s'ha determinat que *RCAN1-1* s'expressa abundantment a cervell fetal i també a cor, cervell i múscul esquelètic adult (Fuentes et al., 1997) (Ermak et al., 2001). Pel que fa a *RCAN1-4*, inicialment es va detectar la seva expressió a ronyó i cor fetal i també a múscul esquelètic i placenta en adult, però no a cervell (Fuentes et al., 1997). Recentment, s'ha demostrat la presència de *RCAN1-4* a cervell (Ermak et al., 2002).



**Figura 6.** Estructura gènica de *RCAN1* humana i dels transcrits *RCAN1-1* i *RCAN1-4* més abundants que genera per *splicing* alternatiu (figura adaptada de Davies i col., 2007)

L'any 1997, Fuentes i col. van descriure l'existència de promotors alternatius pels diferents transcrits de *RCAN1* (Fuentes et al., 1997). Posteriorment, Yang i col. van identificar un segment intragènic de vora 900 pb localitzat entre els exons 3 i 4 amb 15 llocs d'unió per NFAT, que no es trobava en el promotor de *RCAN1-1* (Yang et al., 2000a). Els mateixos autors van demostrar que l'expressió de *RCAN1-4*, però no la de *RCAN1-1*, és estimulada a través de la via Cn-NFAT.

L'estimulació de l'expressió de *RCAN1-4* a través de la via Cn-NFAT s'ha caracteritzat a diferents teixits i emprant diferents estímuls: en diverses línies cel·lulars, U373 (astrocitoma), SH-SY5Y (neuroblastoma), U251 (astroglioma), Jurkat (limfòcits T) o limfòcits T humans, emprant diferents estímuls com ionomicina+PMA, peròxid d'hidrogen o el pèptid amiloide  $A\beta_{1-42}$  (Ermak et al., 2001; Fuentes et al., 2000; Lin et al., 2003; Narayan et al., 2005); en ratolins transgènics que expressen la CnA\* a cor (Yang et al., 2000a); en cèl·lules C2C12 estimulades amb ionomicina, independentment dels seu estat de diferenciació, mioblasts o miotubs (Yang et al., 2000a); en cardiomiòcits aïllats de rata mitjançant inducció mecànica directe (Wang et al., 2002); en cèl·lules HUVEC (per *human umbilical vein endothelial cells*) estimulades amb VEGF (per *vascular endothelial growth factor*) i trombina i amb menys mesura també TNF (Hesser et al., 2004; Minami et al., 2004); en cèl·lules neurals PC12 a les quals se'ls ha administrat KCl que promou la seva despolarització (Cano et al., 2005) i també en cèl·lules *stem* de la cresta neural estimulades amb TGF $\beta$  (Mann et al., 2004); en cèl·lules de càncer de tiroides que expressen el receptor GPR54 (per *G protein-coupled receptor 54*) en presència del seu lligand metastina (Stathatos et al., 2005) i en càncer de colon a través de l'activació del receptor PPAR $\gamma$  (Bush et al., 2007).

Els mecanismes de regulació del transcrit *RCAN1-1*, que no es regula a través de la via Cn-NFAT, descrits fins ara són: en cèl·lules 697 de leucèmia pre-B, l'administració de glucocorticoides (GC) estimula la transcripció de *RCAN1-1*, malgrat no tenir llocs responedors a GC en la regió 5' flanquejant a l'exó 1 (U et al., 2004); en cardiomiòcits aïllats de rata, l'administració de 17 $\beta$ -estradiol estimula la transcripció de *RCAN1-1* a través de la via de senyalització de la PI3K (per *phosphatidylinositol 3-kinase*) (Pedram et al., 2005); en

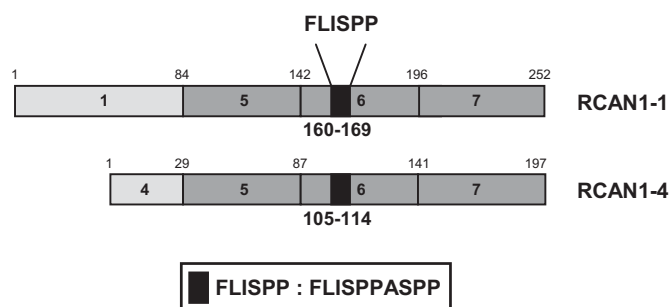
queratinòcits, l'activació de NOTCH 1 promou que el factor de transcripció HES-1 (per *hairy and enhancer of split 1*) inhibeixi l'expressió gènica de *RCAN1-1* (Mammucari et al., 2005).

A ratolí, el gen *Rcan1* està localitzat al cromosoma 16, 16C4, i està format per 5 exons, conservant l'estructura gènica descrita per l'ortòleg humà. Existeixen dos transcrits a ratolí, *Rcan1-1* i *Rcan1-2*, que corresponen als transcrits *RCAN1-1* i *RCAN1-4* humans, respectivament.

Mitjançant transferència de *Northern*, alguns autors han identificat un mRNA de vora 2.2 kb present sobretot a cor i a múscul *soleus* (Rothermel et al., 2000). Altres han demostrat la presència d'aquest mRNA a embrions murins i a diversos teixits adults, essent els més abundants, a cor, cervell, múscul esquelètic i ronyó (Casas et al., 2001). En canvi, altres autors han mostrat que *Rcan1* s'expressa abundantment a cor i ronyó, significativament menys a cervell, fetge i testicle i no s'expressa a múscul esquelètic (Porta et al., 2007a). L'anàlisi acurada de diverses regions del cervell ha revelat que el transcrit *Rcan1-2* s'expressa significativament més que el *Rcan 1-1* en totes les regions analitzades.

### 10.1.2. Estructura i funció de la proteïna RCAN1

Inicialment, es va descriure que ambdós transcrits, *RCAN1-1* i *RCAN1-4*, codificaven per dues proteïnes RCAN1-1 i RCAN1-4 de 197 aminoàcids, que únicament diferien en el primer exó. Posteriorment, es va descriure que la isoforma RCAN1-1 incloïa 55 aminoàcids més a l'extrem N-terminal de l'exó 1, i que en realitat la proteïna tenia 252 aminoàcids (Genesca et al., 2003)(Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de RCAN1-1 i RCAN1-4 humanes. El requadre negre correspon al motiu FLISPP. La seqüència del motiu es mostra en detall a la llegenda. També s'indiquen les posicions de l'aminoàcid final de cada exó així com els aminoàcids inclosos al motiu FLISPP.

S'ha demostrat que RCAN1 és una fosfoproteïna que pot ser fosforilada als residus serina del motiu FLISPP per la GSK3 i per la MAPK a mamífers, i la Mck1, a llevats (Hilioti et al., 2004; Vega et al., 2002). A més, també s'ha descrit l'existència d'un altre lloc de fosforilació independent de la fosforilació dels residus serina del FLISPP però encara no es coneix on es localitza (Genesca et al., 2003).

Alguns autors han suggerit que l'estat de fosforilació de RCAN1 regula la seva localització cel·lular. Rothermel i col. van demostrar que RCAN1 resideix habitualment al nucli però que en presència de CnA\* està a citoplasma (Rothermel et al., 2000). Altres autors han demostrat que RCAN1 es localitza a citoplasma i presenta un marcatge perinuclear que suggereix que probablement RCAN1 podria estar a RE (Leahy and Crawford, 2000). Per últim, Pfister i col. van realitzar una anàlisi acurada de la distribució cel·lular de RCAN1 i van demostrar que resideix a nucli, però que la mutació de diversos residus treonina i serina a alanina reverteix la seva localització que passa a ser citoplasmàtica (Pfister et al., 2002). A més, la deleció dels 33 aminoàcids del seu extrem C-terminal també provoca que RCAN1 estigui localitzada a citoplasma. Aquests resultats correlacionen amb el fet de que en teixits cerebrals de malalts d'Alzheimer, que tenen menor activitat fosfatasa de Cn, RCAN1 es localitza al nucli de les cèl·lules piramidals (Cook et al., 2005).

També s'ha descrit que l'estat de fosforilació de RCAN1 modula la vida mitja de la proteïna. Resultats contradictoris s'han obtingut en *C. neoformans* o en cèl·lules de mamífer, indicant els primers que la fosforilació incrementaria l'estabilitat de la proteïna mentre que els segons mostren que la disminueix (Genesca et al., 2003; Gorchach et al., 2000).

A més, l'estat de fosforilació de RCAN1-1 modula la seva funció. La substitució dels residus serina del motiu FLISPP a alanina provoca que aquestes formes mutants de RCAN1-1 inhibeixin de manera menys eficient l'activitat fosfatasa de Cn (Genesca et al., 2003). Per altra banda, Abbasi i col. van demostrar que quan RCAN1-4 es troba desfosforilada s'uneix i inhibeix a Cn però quan està fosforilada, s'allibera de Cn i interacciona amb la proteïna 14-3-3 (Abbasi et al., 2006)

A llevat i a cèl·lules de mamífer s'ha demostrat que RCAN1 és substrat de Cn *in vitro* i pot ser desfosforilada per la pròpia fosfatasa (Hilioti et al., 2004; Vega et al., 2002).

Tal i com s'ha descrit a l'apartat 10.1.1, l'expressió del transcrit *RCAN1-4* és induïda per la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT. Això indica que la proteïna RCAN1-4, a l'igual que el recentment caracteritzat inhibidor endogen de Cn, Carabin, estableix un cicle de retroalimentació negativa en el qual el propi RCAN1-4 inhibiria a Cn (Yang et al., 2000a).

Per últim, en els darrers anys s'ha qüestionat el paper fisiològic de RCAN1, arran dels resultats obtinguts amb els models murins deficients en aquesta proteïna (Ryeom et al., 2003; Sanna et al., 2006; Vega et al., 2003). Tot i que inicialment es va considerar que RCAN1 era un inhibidor de Cn, actualment es pensa que pot jugar un paper dual d'inhibidor o de facilitador de l'activitat de Cn en funció de la dosi de RCAN1 present a la cèl·lula. El fenotip de diversos teixits analitzats d'aquests ratolins deficients en *Rcan1* es descriurà en detall a l'apartat 10.1.2.1.

A ratolí, els transcrits *Rcan1-2* i *Rcan1-2* codifiquen per les proteïnes Rcan1-1 i Rcan1-2 de 251 i 198 aminoàcids, respectivament. Recentment, s'ha descrit per transferència de *Western* emprant cervell adult i cervell post-natal en desenvolupament a dia 5 (PD5, per *post-natal day* 5) que la isoforma Rcan1-1 és més abundant que Rcan1-2 en totes les regions

analitzades. A més, tant la isoforma Rcan1-1 com la Rcan1-2 són més abundants en teixit adult que en PD5 (Porta et al., 2007a).

#### 10.1.2.1. Implicacions funcionals de la interacció RCAN1-Cn

RCAN1 interacciona amb Cn i participa en múltiples funcions, algunes de les quals es descriuen en detall a continuació.

L'any 2000, de manera simultània quatre grups independents van descriure que RCAN1 interacciona i inhibeix Cn (Fuentes et al., 2000; Gorchach et al., 2000; Kingsbury and Cunningham, 2000; Rothermel et al., 2000). Inicialment, es va descriure que RCAN1 interacciona amb Cn a través dels 83 aminoàcids del seu extrem C-terminal (Fuentes et al., 2000). Altres autors van demostrar que és necessària una regió més gran que inclou un motiu semblant al motiu PxlXT dels NFAT i el motiu FLISPP (Rothermel et al., 2000). Posteriorment, altres autors han demostrat que el motiu FLISPP ni és necessari ni és suficient per unir o inhibir a Cn i que caldrien regions localitzades als extrems N-terminal i C-terminal per interaccionar i inhibir completament a Cn (Vega et al., 2002).

Pel que fa a Cn, s'ha suggerit que aquesta s'uneix a RCAN1 a través de la seva regió anomenada *linker* o d'alguna regió propera (Fuentes et al., 2000; Rothermel et al., 2000).

La interacció RCAN1-Cn té diverses implicacions funcionals segons el tipus cel·lular o teixit considerat en el qual té lloc:

- Cervell: Donat que el gen humà *RCAN1* està localitzat al cromosoma 21 i la Síndrome de Down (SD) es caracteritza per la trisomia total o parcial d'aquest cromosoma, s'ha estudiat la funció de RCAN1 en diversos processos neurològics. S'ha demostrat en fetus amb SD que l'expressió del mRNA de RCAN1 està incrementada (Chang et al., 2003; Fuentes et al., 2000). Els malalts amb SD també desenvolupen de manera prematura malaltia d'Alzheimer. En malalts d'Alzheimer s'ha detectat menys activitat de Cn (Ladner et al., 1996) i més expressió de *RCAN1* tant a nivell de mRNA com de proteïna, essent la isoforma *RCAN1-1* la més abundant (Cook et al., 2005; Ermak et al., 2001; Harris et al., 2007). S'ha suggerit que davant d'un estrès oxidatiu agut, RCAN1 pot tenir un paper protector a curt termini mentre que la sobreexpressió a llarg termini de RCAN1 pot estar associada a la progressió de la malaltia d'Alzheimer (Ermak et al., 2001). En aquest sentit, el propi RCAN1 estimula la transcripció de *SOD1*, que a l'igual que RCAN1 pot fer funcions diferents segons els seus nivells d'expressió (Ermak et al., 2004). Recentment, s'ha descrit que RCAN1 indueix l'expressió de *GSK3β* (Ermak et al., 2006). Aquest fet juntament amb la inhibició de Cn per RCAN1 poden provocar la hiperfosforilació de la proteïna TAU, que és substrat tant de la fosfatasa com de la quinasa. La proteïna TAU hiperfosforilada és menys susceptible de ser degradada pel proteasoma i tendeix a formar agregats, característics de la malaltia d'Alzheimer i d'altres taupaties (Poppek et al., 2006). Per altra banda, en models murins deficientes en *Rcan1* davant d'un estrès oxidatiu, les neurones són més resistents a morir que



les dels ratolins salvatges (Porta et al., 2007b). Això indica que canvis en la concentració de RCAN1 poden ser responsables de la neurodegeneració detectada en pacients amb SD o malalts d'Alzheimer.

Mitjançant l'ús de mutants de mosca amb pèrdua o guany de funció de l'ortòleg de *RCAN1* s'ha pogut demostrar que la seva dosi és crítica en els processos d'aprenentatge i en l'establiment de la memòria a llarg termini (Chang et al., 2003). A més, la sobreexpressió de RCAN1 genera agregats que alteren els processos d'endocitosi necessaris per la correcta transmissió sinàptica (Keating et al., 2006; Ma et al., 2004). Per contra, models murins deficientes en *Rcan1* i *Rcan2* mostren alteracions en el comportament i en la memòria a curt termini similars als del models mutants *CnB1<sup>-/-</sup>*, suggerint el paper facilitador de RCAN1 *in vivo* (Sanna et al., 2006).

Per últim, la inhibició de Cn per part de RCAN1 és un factor de protecció davant l'infart cerebral perquè evita la desfosforilació de l'enzim nNOS, que provoca neurotoxicitat, i evita la desfosforilació de BAD, que condueix a l'apoptosi (Harris et al., 2005).

- Cor: Inicialment es va analitzar el paper de RCAN1 en la regulació de la hipertròfia cardíaca degut a la funció crucial de Cn en aquest procés biològic.

La sobreexpressió de RCAN1-4 específicament a cor va mostrar que RCAN1-4 inhibeix notablement la hipertròfia provocada per l'expressió de la CnA\*, així com per l'administració d'isoproterenol o l'exercici continuat (Rothermel et al., 2001). En canvi, en extractes de cor de ratolins *Rcan1<sup>-/-</sup>* es va detectar una disminució de vora el 45% de l'activitat fosfatasa de Cn. A més, la deleció de *Rcan1* va mostrar que en funció de l'estímul hipertròfic emprat, *Rcan1* podria funcionar com inhibidor, en ratolins transgènics amb la CnA\*, o com facilitador de l'activitat de Cn, quan als ratolins se'ls lligava l'aorta o se'ls administrava isoproterenol (Vega et al., 2003). Resultats similars es van obtenir amb ratolins deficientes en *Rcan1* i *Rcan2* i delectant els ortòlegs de *RCAN1* a *S.cerevisiae* i *C.neoformans*, apuntant al paper facilitador de RCAN1 *in vivo* (Gorlach et al., 2000; Kingsbury and Cunningham, 2000; Sanna et al., 2006).

Altres autors han demostrat que la sobreexpressió de RCAN1-4 protegeix davant la hipertròfia que apareix després d'un infart de miocardi i millora la supervivència (van Rooij et al., 2004). Per últim, també s'ha demostrat la participació de RCAN1-4 en la regulació de la formació de les vàlvules cardíques i el septe (Lange et al., 2004) (Wu et al., 2007a).

- Múscul esquelètic: En mioblasts i miotubs s'ha descrit que RCAN1-4 inhibeix tant la Cn estimulada amb ionomicina+PMA com la CnA\* (Rothermel et al., 2000). Per altra banda, la generació de models murins ha demostrat que la modulació de l'activitat de Cn per part de RCAN1 és dual. Ratolins transgènics adults que sobreexpressen RCAN1 específicament a múscul esquelètic tenen inhibida l'activitat fosfatasa de Cn (Oh et al., 2005). A més, malgrat que RCAN1 no provoca la disminució del nombre de fibres musculars, aquestes presenten un canvi en el fenotip donant lloc a una disminució dramàtica de fibres de fenotip lent. Aquest



fet provoca que fibres de fenotip ràpid intentin compensar la falta de fibres de fenotip lent. Altres autors en canvi han mostrat que l'exercici continuat promou l'aparició d'un fenotip lent a les fibres musculars en els ratolins salvatge mentre que els ratolins 2 KO per *Rcan1* i *Rcan2* no mostren aquest canvi de fenotip (Sanna et al., 2006). Finalment, també s'ha descrit que en cèl·lules *stem* de la cresta neural RCAN1 inhibeix l'activació de la diferenciació de múscul llis mediada per Cn (Mann et al., 2004).

- Sistema vascular: L'estimulació de cèl·lules endotelials amb VEGF promou l'activació transcripcional de *RCAN1-4* (Abe and Sato, 2001). Alguns autors han mostrat que RCAN1 inhibeix l'angiogènesi, redueix la densitat dels vasos sanguinis, l'adhesió cel·lular i la mida dels tumors *in vivo* (Minami et al., 2004; Minami et al., 2006; Yao and Duh, 2004). Per contra, altres han demostrat l'efecte contrari, suggerint que RCAN1 té un paper pro-angiogènic (Iizuka et al., 2004). Recentment, s'ha suggerit que la regulació de l'angiogènesi depèn de la isoforma considerada: RCAN1-4 tindria una funció anti-angiogènica mentre que RCAN1-1 seria pro-angiogènica (Qin et al., 2006).

- Sistema immunitari: Diversos treballs mostren que en cèl·lules endotelials estimulades amb VEGF la sobreexpressió de RCAN1 atenua l'expressió dependent de Cn-NFAT de diverses molècules pro-inflamatòries, com COX-2, E-selectina i el factor tissular (Hesser et al., 2004; Minami et al., 2006). En paral·lel, NFκB també estimula la transcripció de citocines pro-inflamatòries, així que donat que la IκBβ és substrat de Cn, alguns autors han proposat que RCAN1 podria inhibir els processos inflamatoris mediat per NFκB (Biswas et al., 2003). A més, segons altres autors, RCAN1 també seria responsable d'estabilitzar la IκBα i disminuir la transcripció de citocines pro-inflamatòries (Kim et al., 2006).

La caracterització de la resposta immune emprant models murins deficientes en *Rcan1* ha donat lloc a resultats en part similars i en part oposats (Ryeom et al., 2003; Sanna et al., 2006). Ambdós models mostren que els ratolins *Rcan1*<sup>-/-</sup> tenen el nombre de cèl·lules B i cèl·lules T CD3+, CD4+ i CD8+ semblants al dels ratolins salvatges. A més, també mostren que els limfòcits T CD4+ dels ratolins deficientes tenen un nivell d'apoptosi major. En canvi, Ryeom i col. mostren que l'activitat fosfatasa de Cn és major en limfòcits T CD4+ dels animals *Rcan1*<sup>-/-</sup> que en els salvatges, confirmant el paper de RCAN1 com un inhibidor endògen de Cn (Ryeom et al., 2003). A més, els ratolins *Rcan1*<sup>-/-</sup> expressen menys IFNG i IgG2 i mostren alteracions en la proliferació i mort de les cèl·lules Th1. Això és degut a que presenten una disminució en els llindars d'activació de la transcripció de diverses citocines, entre elles *IL2* i *IFNG*, a més d'una expressió prematura de FASL, la qual cosa promou la mort cel·lular de les cèl·lules Th1 (Ryeom et al., 2003). Per la seva banda, Sanna i col. demostren que els ratolins *Rcan1*<sup>-/-</sup> no tenen una activació de les cel·lules T CD4+ disminuïda ni tampoc una reducció en l'expressió gènica de *IFNG* o *IL4* (Sanna et al., 2006). A més, la generació del triple mutant deficient en *CnAβ/Rcan1/Rcan2* no rescata el fenotip apoptòtic que presenten els ratolins *Rcan1*<sup>-/-</sup> sino

que encara mostren més apoptosi, suggerint el paper facilitador de RCAN1 *in vivo* (Sanna et al., 2006).

#### 10.1.2.2. Altres proteïnes que interaccionen amb RCAN1

En els darrers anys, s'ha descrit que RCAN1 interacciona amb altres proteïnes, a part de Cn. S'ha demostrat que RCAN1 interacciona amb la integrina  $\alpha v\beta 3$  suggerint un paper en angiogènesi (Iizuka et al., 2004); la isoforma RCAN1-4 interacciona amb RAF1 a través de dues regions, una d'elles localitzada al seu extrem N-terminal i una altra situada al C-terminal que estaria enmascarada per un domini inhibidor (Cho et al., 2005) i la isoforma RCAN1-4 interacciona amb la proteïna UXP (per *ubiquitously-expressed transcript NP\_705582*) suggerint que podrien interaccionar formant part d'un complex transcripcional (Silveira et al., 2004)

### 10.2. Regulador de la calcineurina 2, RCAN2

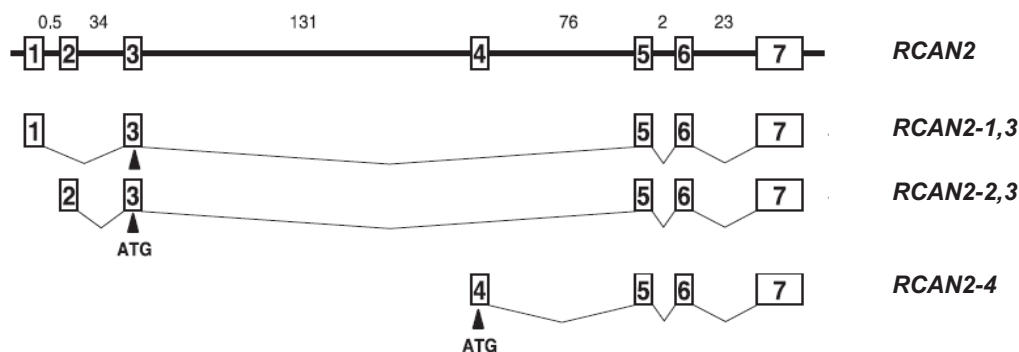
El gen humà *RCAN2*, també anomenat *ZAKI-4*, *DSCR1L1* o *MCIP2*, va ser identificat l'any 1996 en un cribratge realitzat per identificar gens que poguessin ser regulats mitjançant hormones tiroidees (tiroxina i 3'3',5-triiodotironina ( $T_3$ )) en fibroblasts de pell humana (Miyazaki et al., 1996). Recentment, s'ha clonat *Rcan2* que és el corresponent ortòleg a ratolí (Mizuno et al., 2004).

#### 10.2.1. Estructura gènica i patró d'expressió de *RCAN2*

El gen humà *RCAN2* està localitzat al cromosoma 6, 6p12.3, i està format per 7 exons, dels quals els dos primers, l'exó 1 i l'exó 2, són no codificants. Mitjançant *splicing* alternatiu *RCAN2* dona lloc a tres transcrits diferents: *RCAN2-1,3*, *RCAN2-2,3* i *RCAN2-4*. Els tres transcrits de *RCAN2* tenen en comú els exons 5, 6 i 7, i utilitzen els exons 1, 2 i 4, respectivament, com a primers exons de manera alternativa i excloent. Donat que els exons 1 i 2 són no codificants, tant el transcrit *RCAN2-1,3* com *RCAN2-2,3* codifiquen per la mateixa proteïna (Cao et al., 2002) (Figura 8).

Mitjançant transferència de *Northern* s'han identificat dos transcrits diferents amb una mida estimada de 3.4 i 1.4 kb, donat que els transcrits de *RCAN2* tenen dos possibles llocs de poliadenilació (Cao et al., 2002; Miyazaki et al., 1996). Inicialment, es va descriure que *RCAN2* s'expressava abundantment a cervell, múscul esquelètic, cor i fetge mentre que a placenta, pulmó, ronyó i pàncreas no es detectava (Miyazaki et al., 1996). La identificació dels diferents transcrits ha permès determinar que *RCAN2-4* s'expressa exclusivament a cervell, mentre que *RCAN2-1,3* i *RCAN2-2,3* s'expressen ubiquament, essent més abundants a cervell, cor, múscul esquelètic i ronyó (Cao et al., 2002).

L'única regulació transcripcional de *RCAN2* caracteritzada fins al moment és la corresponent a les hormones tiroidees (Miyazaki et al., 1996). En fibroblasts de pell humana, la T<sub>3</sub> estimula la transcripció de *RCAN2-4* a través d'una via de senyalització mediada per mTOR, donat que l'administració de rapamicina bloqueja significativament la seva expressió (Cao et al., 2005), però no afecta a la dels altres dos transcrits (Cao et al., 2002). A diferència de *RCAN1*, la transcripció de *RCAN2* no està regulada a través d'un senyal de Ca<sup>2+</sup> (Yang et al., 2000a).



**Figura 8.** Estructura gènica de *RCAN2* humana i dels transcrits que es generen per *splicing* alternatiu. Els triangles indiquen els llocs de poliadenilació (*figura adaptada de Davies i col., 2007*)

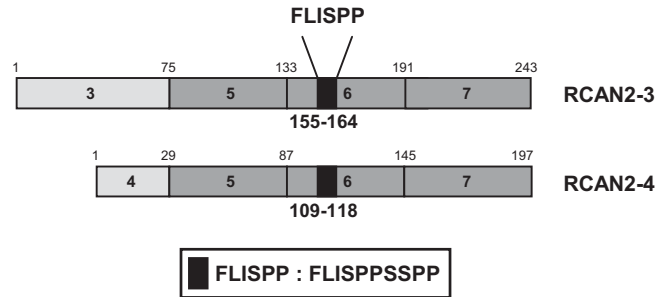
A ratolí, el gen *Rcan2* està localitzat al cromosoma 17, 17C, i està format també per 7 exons, conservant l'estructura gènica descrita per l'ortòleg humà. Existeixen dos transcrits a ratolí, *Rcan2-1* i *Rcan2-3*, que corresponen als transcrits *RCAN2-2,3* i *RCAN2-4* humans, respectivament. Els exons 6 i 7 contenen dos llocs de poliadenilació (Mizuno et al., 2004).

Mitjançant transferència de *Northern*, alguns autors han identificat dos mRNA de 3.4 i 1.4 kb aproximadament, presents a cervell, cor i múscul *soleus* (Rothermel et al., 2000). Altres han mostrat que l'expressió de *Rcan2-1* és exclusiva de cervell, mentre que *Rcan2-3* s'expressa a cervell, cor, múscul esquelètic i ronyó (Mizuno et al., 2004). Altres autors han mostrat que l'expressió de *Rcan2* només es detecta a cor i a cervell, estant el producte de 3.4 kb present a ambdós teixits, mentre que el de 1.4 kb només està a cor. Amb assaigs de PCR semiquantitativa a temps real han demostrat que *Rcan2* s'expressa a les diferents regions de cervell adult analitzades, detectant-se majors nivells de *Rcan2-1* en unes i de *Rcan2-3* en altres (Porta et al., 2007a).

Per últim, en models de rata amb hipotiroidisme també s'ha vist que els nivells de mRNA de *Rcan2* estan disminuïts al cortex cerebral però no al cerebel (Siddiq et al., 2001).

### 10.2.2. Estructura i funció de la proteïna RCAN2

Els transcrits humans identificats fins al moment codifiquen per dues proteïnes: RCAN2-3 i RCAN2-4, amb una mida de 243 i 197 aminoàcids, respectivament (Figura 9).



**Figura 9.** Estructura de les isoformes de RCAN2 humà. El requadre negre correspon al motiu FLISPP. La seqüència del motiu es mostra en detall a la llegenda. També s'indiquen les posicions de l'aminoàcid final de cada exó així com els aminoàcids inclosos al motiu FLISPP.

Fuentes i col. van demostrar que RCAN2 interacciona amb Cn, inhibeix la translocació nuclear de NFAT i també inhibeix la transcripció dependent de NFAT (Fuentes et al., 2000). Temps després, Cao i col. van identificar les dues isoformes que es coneixen actualment, RCAN2-3 i RCAN2-4, i van confirmar que ambdues inhibeixen l'activitat fosfatasa de Cn, suggerint un paper inhibidor per a RCAN2 envers la via de senyalització Cn-NFAT (Cao et al., 2002). Els motius de RCAN2 implicats en aquesta interacció no s'han identificat. Recentment, s'ha demostrat que aquest paper inhibidor de RCAN2 envers Cn és el responsable d'inhibir l'angiogènesi promoguda per VEGF en cèl·lules endotelials (Gollogly et al., 2007).

Tot i l'efecte inhibidor de RCAN2 envers l'activitat de Cn, el desenvolupament de models murins deficientes en *Rcan2* han suggerit que, a l'igual que passa amb *Rcan1*, RCAN2 podria tenir un efecte facilitador de l'activitat fosfatasa de Cn *in vivo* (Sanna et al., 2006). Aquest efecte facilitador s'ha demostrat en diferents teixits de manera similar a com s'ha descrit anteriorment per RCAN1 en ratolins *Rcan2*<sup>-/-</sup> i deficientes per *Rcan1* i *Rcan2* (Sanna et al., 2006).

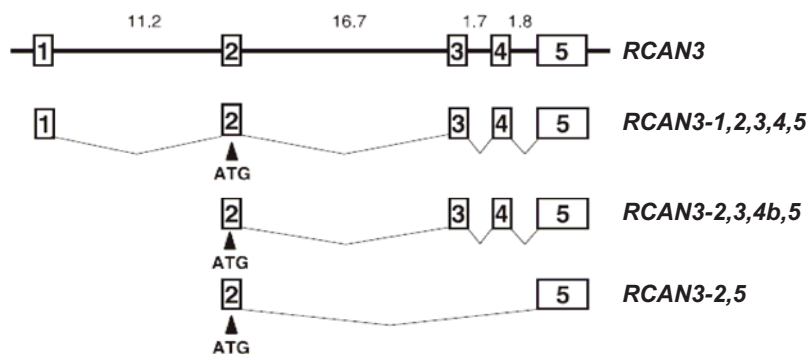
A ratolí, els transcrits *Rcan2-1* i *Rcan2-3* codifiquen per les proteïnes Rcan2-1 i Rcan2-3, de 243 i 197 aminoàcids respectivament. Recentment, s'ha descrit per transferència de *Western* emprant cervell adult i cervell post-natal en desenvolupament (PD5) que la isoforma Rcan2-3 és més abundant que Rcan2-1 en totes les regions analitzades. En canvi, la isoforma Rcan2-1 predomina en PD5 mentre que està absent en cervell adult. A més, s'ha pogut constatar l'expressió de Rcan2 en còrtex cerebral de PD5 així com en el nucli de les cèl·lules de Purkinje, mentre que Rcan1 es detectava al citoplasma de les cèl·lules de Purkinje (Porta et al., 2007a).

### 10.3. Regulador de la calcineurina 3, RCAN3

El gen humà *RCAN3*, també anomenat *DSCR1L2* o *MCIP3*, va ser identificat l'any 2000 mitjançant predicció informàtica donada la seva similitud amb *RCAN1* i *RCAN2* (Strippoli et al., 2000a).

#### 10.3.1. Estructura gènica i patró d'expressió de *RCAN3*

El gen humà *RCAN3* està localitzat al cromosoma 1, 1p36.11, i està format per 5 exons, el primer dels quals no es tradueix a proteïna. Mitjançant *splicing* alternatiu *RCAN3* dóna lloc a tres transcrits diferents: *RCAN3-1,2,3,4,5*, *RCAN3-2,3,4b,5* i *RCAN3-2,5*. Els transcrits *RCAN3-1,2,3,4,5* i *RCAN3-2,3,4b,5* estan formats pels 5 exons amb l'única diferència que *RCAN3-2,3,4b,5* té 30 pb menys en la seva regió central (exó 4), que no li comporta cap canvi en la pauta de lectura (Strippoli et al., 2000a). En canvi, *RCAN3-2,5* només està format per l'exó 2 i l'exó 5, i conté un canvi en la pauta de lectura que afecta íntegrament a tota la seqüència de l'exó 5 (Canaider et al., 2006) (Figura 10).



**Figura 10.** Estructura gènica de *RCAN3* humà i dels transcrits que es generen per *splicing* alternatiu (figura adaptada de Davies i col., 2007).

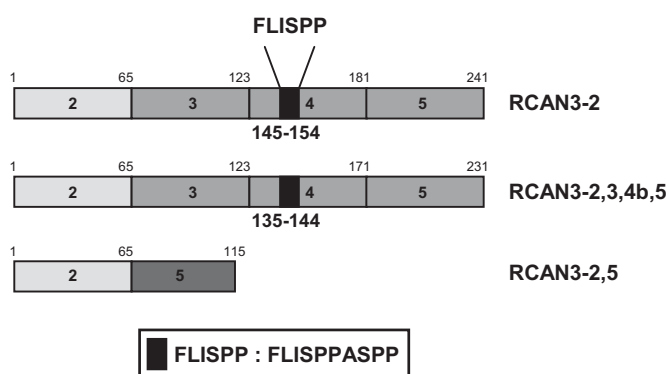
Mitjançant transferència de *Northern* s'han identificat tres transcrits diferents amb una mida estimada de 3.2, 5.2 i 7.5 kb a diversos teixits humans, essent més abundants a cor, múscul esquelètic, ronyó i fetge (Strippoli 2000). Pel que fa al transcrit *RCAN3-2,5*, mitjançant RT-PCR s'ha pogut determinar la seva presència a cor adult, múscul esquelètic i cervell, estant en el cas del cor, en una proporció 1:3,5 respecte del transcrit *RCAN3-1,2,3,4,5* (Canaider et al., 2006).

A ratolí, el gen *Rcan3* està localitzat al cromosoma 4, 4D3, i està format també per 5 exons, conservant l'estructura gènica descrita per l'ortòleg humà. Fins al moment, s'ha descrit l'existència d'un únic transcrit a ratolí, *Rcan3*, que correspon al *RCAN3-1,2,3,4,5* humà. Mitjançant transferència de *Northern*, alguns autors han identificat dos mRNA de 4.4 i 1.8 kb aproximadament, presents en diferent teixits, essent els més abundants a cor i fetge

(Strippoli et al., 2000b). En canvi, altres autors han mostrat que únicament existeix un mRNA de vora 5 kb expressat preferentment a cervell, i en menor mesura a cor, ronyó i testicles. Amb assaigs de PCR semiquantitativa a temps real s'ha demostrat que *Rcan3* s'expressa a les diverses regions de cervell adult analitzades, detectant-se els majors nivells de mRNA a cerebel i els menors a hipocamp (Porta et al., 2007a).

### 10.3.2. Estructura i funció de la proteïna RCAN3

Els transcrits identificats fins al moment *RCAN3-1,2,3,4,5*, *RCAN3-2,3,4b,5* i *RCAN3-2,5*, codifiquen per tres proteïnes: RCAN3-2, RCAN3-2,3,4b,5 i RCAN3-2,5, amb una mida de 241, 231 i 115 aminoàcids, respectivament (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura de les isoformes de RCAN3 humà. El requadre negre correspon al motiu FLISPP. La seqüència del motiu es mostra en detall a la llegenda. També s'indiquen les posicions de l'aminoàcid final de cada exó així com els aminoàcids inclosos al motiu FLISPP.

L'any 2006, Canaider i col. van demostrar mitjançant assaigs de doble híbrid en llevat i *pull down* que les proteïnes RCAN3-2 i RCAN3-2,5 interaccionen a través de l'exó número 2 amb una de les isoformes de la troponina 1 present a múscul cardíac, TNNI3 (Canaider et al., 2006). La TNNI3 s'expressa específicament a cor i això ha permès que s'hagi suggerit un possible paper de RCAN3 en la contracció cardíaca, tot i que fins al moment no s'ha confirmat des d'un punt de vista funcional.

A ratolí, l'únic transcrit identificat fins al moment codifica per la proteïna *Rcan3* de 239 aminoàcids que té un 89% d'homologia respecte de l'ortòleg humà RCAN3-2. Recentment, s'ha realitzat l'anàlisi per transferència de *Western* de la distribució de *Rcan3* en cervell adult i en cervell post-natal en desenvolupament (PD5). Els resultats mostren l'expressió d'una única isoforma de *Rcan3* tant en el cervell adult com en PD5, detectant-se els nivells d'expressió menors en l'hipocamp. A més, s'ha detectat l'expressió de *Rcan3* a diverses regions del cervell de ratolí, suggerint que RCAN3 podria estar implicat en processos d'aprenentatge i memòria (Porta et al., 2007a).

## 11. ESTRATÈGIES PER BUSCAR DISRUPTORS D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

Tradicionalment la font de composts amb activitat biològica s'ha basat en la síntesi seqüencial de molècules, així com en l'aïllament de productes naturals tant d'origen vegetal com animal. Tot i els èxits remarcables obtinguts, aquestes estratègies són lentes i sovint impliquen la realització d'assaigs biològics llargs i complexos. Per solucionar aquest problema es va desenvolupar la química combinatòria.

### 11.1. La química combinatòria: les quimioteques

La introducció de la química combinatòria i els cribratges d'alta eficàcia han marcat l'evolució del camp del descobriment de fàrmacs en els últims anys. De fet, no hi ha cap empresa farmacèutica i biotecnològica important que no faci servir aquestes eines per millorar l'eficiència i la rapidesa d'identificació de molècules davant de dianes terapèutiques ben diverses (Adang and Hermkens, 2001; Leach and Hann, 2000). Fins l'any 2001, més de quaranta molècules descobertes a partir d'estratègies de química combinatòria, es trobaven ja en fase clínica (Golebiowski et al., 2001).

La química combinatòria permet crear grans col·leccions de composts estructuralment relacionats, anomenades quimioteques, d'una forma sistemàtica, ràpida, eficaç i simultània, per assajar-los davant d'una determinada interacció. Les quimioteques estan estructurades a partir d'un esquelet central, al qual s'hi va introduint la diversitat química a través de les diferents fonts de diversitat utilitzades (Masip). En aquest sentit, les quimioteques de molècules senzilles i per tant, que ofereixen àmplies possibilitats d'optimització estructural, troben cada vegada més acceptació en l'estratègia de cerca de nous fàrmacs (Hann et al., 2001). Hi ha dos tipus de formats de quimioteques: el de composts individuals i el de mescles controlades. En el primer, a cada tub únicament hi ha un producte, mentre que en el segon, cada tub conté una barreja de productes. En aquest darrer cas, la identificació de la molècula o molècules més actives en l'assaig necessita un procés anomenat deconvolució. Mitjançant aquest procés i recorrent a la lògica de la construcció de les mescles, es pot tirar enrere i acabar identificant els productes responsables de l'activitat assajada. Un dels formats més emprats a les mescles és el de rastreig posicional (*positional scanning*) on s'empra una mescla de reactius i es sintetitzen tantes subquimioteques com posicions de diversitat s'hagin d'introduir. Aquestes subquimioteques contindran la totalitat dels productes de la quimioteca, però organitzats de forma diferent en cada mescla. De fet, cada subquimioteca contindrà una posició definida i coneguda, mentre que a les altres hi haurà una mescla de totes les fonts de diversitat possibles.

Les quimioteques s'utilitzen per identificar noves molècules mitjançant cribratge d'alta o de baixa eficàcia (*high or low throughput screening*, HTS o LTS). Les molècules identificades anomenades caps de sèrie o *hits*, entren en una fase que consisteix en el

desenvolupament d'altres molècules optimitzades en base a la seva estructura, però que presenten millor activitat, afinitat, selectivitat i falta de toxicitat.

En aquesta fase la química combinatòria també juga un paper important per dissenyar i sintetitzar quimioteques més reduïdes que presentin les modificacions necessàries de l'estructura química, així com potenciar les seves propietats ADMET (Administració, Distribució, Metabolisme, Excreció i Toxicitat). El cribratge d'aquesta nova quimioteca permetrà la identificació d'una estructura optimitzada o *lead* amb les característiques i propietats idònies per esdevenir, en cas de superar les proves clíniques, un nou fàrmac potencial (Masip).

En els últims anys, la informàtica ha esdevingut una eina complementària al llarg de tot el procés, desenvolupant mètodes computacionals (*in silico*) aplicats tant al disseny de l'estructura dels composts de les quimioteques, per a la identificació de *hits*, com a l'optimització d'aquests, per a la identificació de *leads*. Malgrat els avenços aconseguits en els darrers anys, aquest procés sol trigar de 6 a 12 anys (Figura 12).

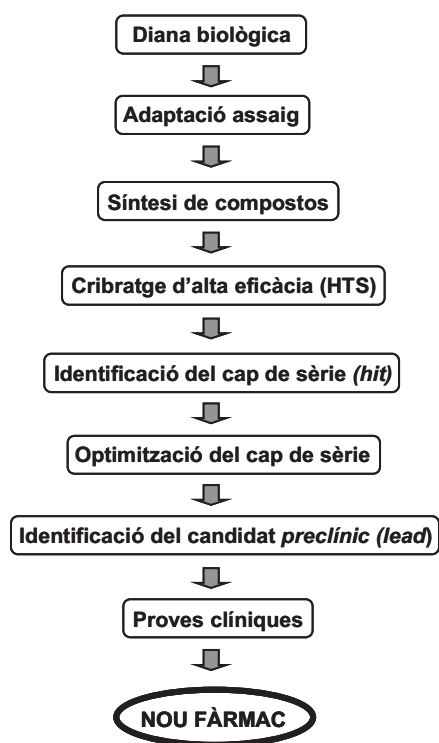


Figura 12. Esquema representatiu de les diferents etapes que inclouen el procés de descobriment d'un fàrmac.

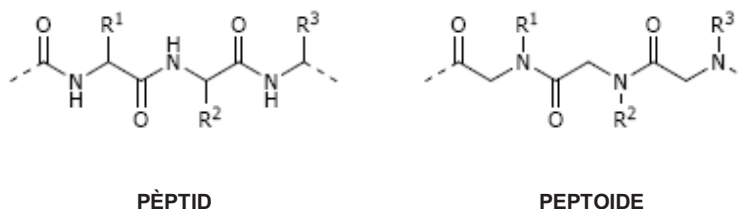
Una de les estratègies emprades per identificar molècules que siguin relativament estables dins la cèl·lula consisteix en utilitzar pèptids formats per D-aminoàcids o peptoides (Masip et al., 2005):

-Els pèptids amb D-aminoàcids tenen l'avantatge davant dels pèptids formats per L-aminoàcids que són menys susceptibles a la degradació per part de les proteases intracel·lulars.

-Els peptoides són peptidomimètics estructuralment semblants als pèptids, per tal de mantenir la seva activitat biològica, però que no presenten els desavantatges d'ells: baixa



disponibilitat oral degut a una baixa absorció intestinal, elevada inestabilitat metabòlica, accions múltiples i amplies fluctuacions en el seu comportament farmacocinètic. Formalment, aquests composts són oligòmers de glicines *N*-substituídes que difereixen estructuralment dels pèptids en el trasllat de les seves cadenes laterals, passant del carboni en alfa a l'àtom de nitrogen de l'enllaç amida (Figura 13).



**Figura 13.** Estructura d'un pèptid i d'un peptoid. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> i R<sup>3</sup> representen la diversitat introduïda per les cadenes laterals.

Aquesta diferència estructural confereix als peptoides una major estabilitat metabòlica i una menor polaritat, característiques que es tradueixen en una elevada resistència a la hidròlisi per part de les proteases de l'organisme, una millor absorció intestinal i, a més, una llibertat conformacional més gran degut a la incapacitat de formar els ponts d'hidrogen que tenen els pèptids. A més, la diversitat química en els peptoides es pot introduir a través d'amines primàries, la qual cosa genera un alt potencial combinatori (Masip et al., 2005).

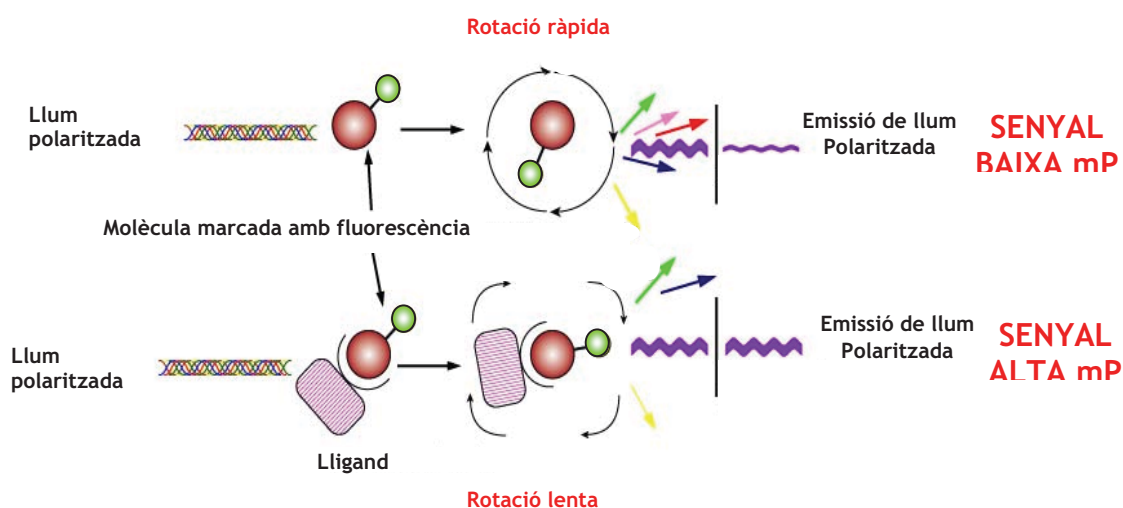
### 11.2. Metodologia de cribratge: anisotropia de fluorescència

El cribratge de molècules per identificar nous fàrmacs es pot realitzar emprant diferents tècniques que van des dels assaigs *in vitro* a la realització d'assaigs *in vivo* funcionals en cèl·lules eucariotes. En aquest sentit, Venkatesh i col. van identificar diverses molècules capaces d'inhibir la translocació de NFAT en cèl·lules HeLa estimulades amb ionomicina (Venkatesh et al., 2004). També Bush i col. van identificar molècules capaces d'estimular la transcripció de *RCAN1-4* en cèl·lules H9c2 transfectades amb una construcció que portava el gen de la luciferasa sota el control del promotor de *RCAN1-4* (Bush et al., 2007).

Per altra banda, els assaigs *in vitro* poden estar basats en la identificació de molècules que modulin l'activitat de la diana d'interès o també en la disrupció d'interaccions proteïna-proteïna. En el primer cas, recentment Sieber i col. han pogut identificar diferents molècules capaces d'inhibir l'activitat fosfatasa de Cn vers el fosfopèptid RII (Sieber et al., 2007). A més, a partir d'elles i mitjançant el disseny de derivats, han pogut identificar molècules que inhibeixen la via de senyalització Cn-NFAT sense inhibir l'activitat fosfatasa de Cn vers el fosfopèptid RII. En el segon cas, Roehrl i col. han identificat molècules que

disrupten la interacció VIVIT-Cn mitjançant la detecció per anisotropia de fluorescència (Roehrl et al., 2004). De fet, existeixen diversos mètodes per detectar la ruptura d'una interacció, com pot ser mitjançant ELISA, però si la interacció analitzada és de poca afinitat aquesta tècnica requereix massa manipulació de la mostra degut a la realització de nombrosos rentats i no és adequada pel cribratge de gran nombre de molècules. En els darrers anys s'ha demostrat que l'anisotropia de fluorescència, que requereix molta menys manipulació de la mostra que un ELISA i que és una tècnica amb una alta sensibilitat, pot ser una metodologia aplicable en la realització de cribratges de grans quimiotèques combinatòries.

Aquesta tècnica està basada en la teoria de la fluorescència polaritzada establerta l'any 1926 per Perrin (Perrin, 1926). Aquesta teoria diu que quan una molècula es troba en un medi líquid, aquesta tendeix a rotar, i la seva velocitat de rotació és inversament proporcional a la mida de la molècula. Si un pèptid marcat fluorescentment es troba lliure en un medi líquid la seva velocitat de rotació serà gran degut a la seva petita mida, mentre que si aquest està interaccionant amb una proteïna, la seva velocitat de rotació resultarà disminuïda donat el major tamany de la molècula resultant de la interacció proteïna-pèptid. Quan aquest sistema és excitat amb un feix de llum polaritzada (que només oscil·la en un únic pla de l'espai), si el pèptid es troba lliure, la seva velocitat de rotació serà gran, i la majoria de llum que emetria el fluoròfor haurà passat a ser dispersada, emetent només una petita quantitat de llum encara polaritzada. En canvi, si el pèptid està interaccionant amb la proteïna, la seva velocitat de rotació serà menor i només emetrà una petita part de la llum dispersada, essent la majoria de la llum emesa del tipus polaritzada. Així doncs, amb aquesta tècnica es podran detectar *in vitro* de manera ràpida i relativament senzilla interaccions proteïna-pèptid (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema representatiu del principi de l'anisotropia de fluorescència. En vermell es mostra el pèptid i en verd el marcatge amb fluoresceïna.

### 11.3. Consideracions en l'ús de quimiotèques combinatòries

El genoma humà conté entre 30.000-35.000 gens, una mica menys del 50% dels quals podrien tenir una funció biològica assignada en base a la seva seqüència. Aquests gens podrien arribar a sintetitzar 100.000 proteïnes, de les quals s'ha estimat que entre 600-1.500 o 5.000-10.000, segons les dades publicades, podrien ser dianes amb potencial terapèutic (Knowles, 2003). Actualment, es considera que el coneixement dels gens, proteïnes i metabòlits és necessari per entendre les funcions integrades del genoma, transcriptoma i metaboloma, però no és suficient. En aquest sentit, l'ús d'animals modificats genèticament amb pèrdua o guany de funció ha permès identificar més clarament l'associació entre una determinada diana i la malaltia que desenvolupa. A més, la identificació de dianes amb potencial terapèutic també ha experimentat una sensible milloria amb l'utilització d'assaigs basats en cèl·lules (Knowles, 2003).

Malgrat el notable avenç que ha suposat l'utilització de la química combinatòria en la identificació de nous fàrmacs, la validació dels *hits* identificats a través del cribratge de llibreries de molècules petites contra una determinada proteïna amb potencial terapèutic ha estat motiu de debat (Black, 1999). Alguns autors han advertit que fa uns anys la cerca de noves molècules estava basada en molècules, hormones i substrats. Aquestes molècules naturals eren els *leads*, i a partir d'elles, es dissenyaven anàlegs i derivats. A més, els assaigs biològics i bioquímics clàssics seleccionaven composts que competien amb la molècula natural pel mateix lloc d'unió i això permetia la identificació de compostos altament específics. L'ús de quimiotèques combinatòries per identificar *hits* podria no ser del tot adient donat que les proteïnes, en les quals es basen aquests tipus d'assaigs, per naturalesa són molècules que tenen una alta capacitat d'interacció. Això podria fer que les interaccions usades als cribratges en combinació amb l'utilització de quimiotèques combinatòries pogués portar a la selecció de molècules no específiques. Aquesta inespecificitat no es veuria reflexada fins que s'utilitzessin models animals *in vivo* (Black, 1999).

Tot i aquest debat obert, en l'actualitat l'utilització dels assaigs basats en interaccions proteïna-proteïna i l'ús de la química combinatòria s'ha estès enormement i ha estat una estratègia fructífera en multitud d'ocasions.



## **OBJECTIUS**



Els Objectius plantejats a l'inici d'aquesta Tesi van ser:

1. Caracterització de l'efecte funcional de la interacció de les proteïnes RCAN amb Cn en la via de senyalització  $\text{Ca}^{2+}$ -Cn-NFAT a limfòcits T humans.

2. Disseny i caracterització d'un assaig *in vitro* d'elevada eficàcia de les interaccions de RCAN1 i RCAN3 amb Cn. Cerca de molècules disruptores de la interacció RCAN1-Cn amb potencial immunosupressor.





## **MATERIALS I MÈTODES**



# CAPÍTOL I: MANIPULACIÓ DE BACTERIS

## ▪ MATERIALS

### 1. SOQUES BACTERIANES

- Soca XL1-Blue: *E. coli* *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lac<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene, La Jolla, CA, USA).
- Soca BL21(DE3) pLysS: *E. coli* B F- *dcm ompT hsdS<sub>(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-)</sub> gal λ* (DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]<sup>a</sup> (Stratagene).

### 2. PLASMIDIS

- *pBluescript SK+* (Stratagene).
- *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* (Promega, Madison, WI, USA).
- *pcDNA3-HA1* Triple HA-tag clonat al *pcDNA3* (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA, USA).
- *pGEX-5X* i *pGEX-6P* (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia).
- *pEGFP*, *pEYFP* i *pCMV-βgal* (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Els vectors *pEGFP* i *pEYFP* van ser cedits amablement pel Dr. Joan Carles Ferrer (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).
- *pHA-NFAT1-GFP* (Aramburu et al., 1999), que conté l'insert *NFAT1* (aminoàcids 1-460) murí, va ser cedit amablement pel Dr. José Aramburu (Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona).
- *3xNFAT-luciferasa* (Aramburu et al., 1999), que conté tres còpies en tàndem del lloc d'unió distal NFAT-AP1 del promotor murí de la *IL2* cedit pel Dr. José Aramburu, i els plasmidis *6xNF-kB-luciferasa* i *pEGFP-p65* (Aguilera et al., 2006; Luo et al., 1996) cedits amablement pel Dr. Lluís Espinosa (COM-IDIBELL, Barcelona).
- *pGEX-6P-1-CnAα* (aminoàcids 2-347) (Roehrl et al., 2004) cedit amablement pel Dr. Patrick Hogan (Center for Blood Research, Boston, MA, USA). L'insert d'aquest vector correspon al domini catalític de la calcineurina A humana, isoforma alfa, que compren els residus del 2 al 347 i que inclou tres substitucions a la regió *linker*: Y341S, L343A i M347D. El seu producte proteic s'anomenarà CnAα(2-347)mutada.

### 3. GENS ANALITZATS

A la Taula 2 es detallen els diferents gens analitzats en aquest treball experimental, així com els corresponents números d'accés de cada transcrit i proteïna dipositats al *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

**Taula 2.** Taula resum de les dades corresponents a cadascun dels diferents gens analitzats durant la realització d'aquest treball experimental.

| Nom del gen  | Símbol        | Localització | mRNA                   | Proteïna                                   |
|--|---------------|--------------|------------------------|--|
| Regulador de la calcineurina 1<br>(abans <i>DSCR1</i> , <i>CALP1</i> , <i>MCIP1</i> i <i>ADAPT78</i> ) | <i>RCAN1</i>  | 21q22.12     | NM_004414<br>NM_203418 | NP_004405 (RCAN1-1)<br>NP_981963 (RCAN1-4) |
| Regulador de la calcineurina 3<br>(abans <i>DSCR1L2</i> , <i>CALP2</i> i <i>MCIP2</i> )                | <i>RCAN3</i>  | 1p35.3-p33   | NM_013441              | NP_038469 (RCAN3-2)                        |
| Proteïna fosfatasa 3 (abans <i>PP2B</i> )<br>Subunitat catalítica, isoforma alfa                       | <i>PPP3CA</i> | 4q21-q24     | NM_000944              | NP_000935 (CnA $\alpha$ )                  |
| Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa  | <i>GAPDH</i>  | 12p13        | NM_002046              | NP_002037                                  |
| Interleuquina 2  | <i>IL2</i>    | 4q26-q27     | NM_000586              | NP_000577                                  |
| Interleuquina 3<br>(factor estimulator de colònies, múltiple)  | <i>IL3</i>    | 5q31.1       | NM_000588              | NP_000579                                  |
| Factor estimulator de colònies 2<br>(granulòcits-macròfags)  | <i>CSF2</i>   | 5q31.1       | NM_000758              | NP_000749                                  |
| Factor de necrosis tumoral<br>(superfamília TNF, membre 2)   | <i>TNF</i>    | 6p21.3       | NM_000594              | NP_000585                                  |

#### 4. ENCEBADORS

A continuació, a les Taules 3 i 4 es detallen els encebadors emprats per la realització dels diferents clonats així com la seqüenciació dels mateixos.

**Taula 3.** Encebadors utilitzats per amplificar els inserts per realitzar els clonats.

| Transcrit amplificat                         | Encebador     | Seqüència                               | Localització encebador | T <sub>a</sub> <sup>(*)</sup> (°C) | Mida (pb) | Diana restricció |
|--|---------------|---|------------------------|------------------------------------|-----------|------------------|
| <i>RCAN1-1</i>                               | XhoIE1D       | 5'-GCGGCTCGAGGAGGACGGCGTGGCCGG-3'       | Exó 1                  | 62                                 | 486       | <i>XhoI</i>      |
|  | XhoIFLISPP    | 5'-GAGGCTCGAGTCACTGCTTGTCTGGATTTGG-3'   | Exó 6                  |                                    |           |                  |
| <i>RCAN1-1</i>                               | XhoIE1D       | 5'-GCGGCTCGAGGAGGACGGCGTGGCCGG-3'       | Exó 1                  | 54                                 | 525       | <i>XhoI</i>      |
|  | DSCR1516RV    | 5'-CATCCTCGAGTACCATCCCCTGGCGGAGAG-3'    | Exó 6                  |                                    |           |                  |
| <i>RCAN1-1</i>                               | XhoIE1D       | 5'-GCGGCTCGAGGAGGACGGCGTGGCCGG-3'       | Exó 1                  | 62                                 | 663       | <i>XhoI</i>      |
|  | XhoIE6RCURT   | 5'-GCGGCTCGAGTCAACTCTCACATACATGG-3'     | Exó 7                  |                                    |           |                  |
| <i>RCAN3-1,2,3,4,5</i>                       | CALP3 532F    | 5'-GACGAATTCTTGGGACCAGGAGAG-3'          | Exó 4/5                | 50                                 | 86        | <i>EcoRI</i>     |
|  | CALP3 609R    | 5'-CCGGAATTCTCAACTTTCACAGACATGAACC-3'   | Exó 5                  |                                    |           |                  |
| <i>CnA<math>\alpha</math></i> <sup>(*)</sup> | FWCnA_2       | 5'-GGCTCGAGTCCGAGCCCAAGGCAATTG-3'       | Exó 1                  | 56                                 | 1053      | <i>XhoI</i>      |
|  | RvCnA_348     | 5'-GGCTCGAGTCAATCCATGAAATTTGGAAGCCAG-3' | Exó 9                  |                                    |           |                  |
| <i>CnA<math>\alpha</math></i> <sup>(*)</sup> | FWCnA_2       | 5'-GGCTCGAGTCCGAGCCCAAGGCAATTG-3'       | Exó 1                  | 54                                 | 1053      | <i>XhoI</i>      |
|  | RvCnA_348_mut | 5'-GGCTCGAGTCAATCCATGAAATTTGGCGCCCA-3'  | Exó 9                  |                                    |           |                  |

(\*) T<sub>a</sub>, significa temperatura d'anellament. (\*) Aquest insert correspon al domini catalític de la calcineurina A humana, isoforma alfa (CnA $\alpha$ ) que comprèn els residus del 2 al 348. El seu producte proteic s'anomenarà d'aquí en endavant CnA $\alpha$ (2-348)wt. (\*) Aquest insert correspon al domini catalític de la calcineurina A humana, isoforma alfa (CnA $\alpha$ ) que comprèn els residus del 2 al 348 i que inclou dues substitucions: Y341S i L343A. El seu producte proteic s'anomenarà d'aquí en endavant CnA $\alpha$ (2-348)mutada.

**Taula 4.** Encebadors dels vectors emprats per seqüenciar els diferents clonats realitzats.

| Encebadors <sup>(*)</sup> | Seqüències                   |
|---------------------------|------------------------------|
| T7                        | 5'-TACGACTCACTATAGGG-3'      |
| T3                        | 5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'      |
| SP6                       | 5'-TTTAGGTGACACTATAG-3'      |
| GST-U                     | 5'-GGCTGGCAAGCCAGTT-3'       |
| GST-D                     | 5'-ATGCAGCTCCCGGA-3'         |
| EGFP-CFW                  | 5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3' |
| EGFP-CRV                  | 5'-GTTTCAGGTTCCAGGGGAGGTG-3' |
| CMVFW                     | 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'  |
| GFPNRev                   | 5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3' |

<sup>(\*)</sup> GST-U i GST-D corresponen als encebadors *upstream* i *downstream*, respectivament, emprats per seqüenciar els inserts clonats als vectors pGEX. Els encebadors EGFP-CFW i EGFP-CRV corresponen al *forward* i al *reverse*, respectivament, utilitzats per seqüenciar els insert clonats al vector pEGFP pel seu extrem C-terminal. CMVFW i GFPNRev corresponen als encebadors *forward* i *reverse*, respectivament, utilitzats per seqüenciar els insert clonats al vector pEYFP pel seu extrem N-terminal. La T<sub>a</sub> utilitzada per a tots aquests encebadors va ser de 50°C.

## ▪ MÈTODES

### 5. CONSTRUCCIÓ DE PLASMIDIS

La generació d'algunes de les construccions utilitzades en aquest treball va implicar l'amplificació mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988) de determinats fragments de cDNA: en alguns casos es va emprar com a motlle cDNA provinent de teixit humà i en altres casos es van utilitzar construccions fetes prèviament al laboratori. Per últim, la generació d'algunes construccions simplement va implicar el subclonatge de determinats inserts des d'un vector a un altre vector.

#### 5.1. Amplificació de l'insert mitjançant PCR i preparació pel seu clonatge

La PCR permet amplificar *in vitro* fragments concrets de DNA genòmic o cDNA mitjançant l'ús d'una polimerasa termostable i encebadors específics, que delimiten el fragment de DNA a amplificar.

❖ Les reaccions es van dur a terme habitualment en 25 µl de volum final i les concentracions finals dels components de la barreja de reacció van ser els següents:

- 0.2 U de *Taq* DNA polimerasa <sup>(\*)</sup> (Roche Diagnostics, IN, USA)
- 2.5 µl Tampó de reacció 10X <sup>(\*)</sup>
- 0.4 µM de cadascun dels encebadors
- 80 µM d'una barreja equimolar de dATP, dTTP, dCTP i dGTP
- 20-50 ng del plasmidi o cDNA total provinent de teixit humà que conté el cDNA a partir del qual es vol amplificar el fragment
- Fins a 25 µl amb aigua destil·lada <sup>(\*)</sup>

<sup>(\*)</sup> Totes les amplificacions inicials dels inserts es van dur a terme amb l'Expand High Fidelity PCR System, que inclou la *Taq* DNA polimerasa i la *Tgo* DNA polimerasa, la combinació d'ambdues dona lloc a una taxa d'error tres cops menors que la *Taq* DNA polimerasa convencional, per tal de minimitzar els canvis de nucleòtid en els fragments de PCR amplificats. Aquesta polimerasa no afegeix adenines als extrems del producte amplificat i

permet clonar els inserts generats, prèvia digestió amb els enzims de restricció adients, la diana dels quals està inclosa en la seqüència de l'encebador, en el vector pBluescript SK<sup>+</sup>. Únicament en l'amplificació dels inserts que codifiquen per CnA $\alpha$ (2-348)wt i CnA $\alpha$ (2-348)mutada es va emprar la Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* BM recombinant, que incorpora adenines als extrems, i permet clonarlos en el pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector.

<sup>(\*)2</sup> En les amplifícacions realitzades amb l'Expand High Fidelity PCR system es va fer servir el tampó n<sup>o</sup>2 inclòs en el kit mentre que amb la Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* BM recombinant es va emprar el tampó que està suplementat amb MgCl<sub>2</sub>. En ambdós casos, els tampons incloïen 15 mM de MgCl<sub>2</sub>.

<sup>(\*)3</sup> Per amplificar alguns fragments especialment rics en G i C, va ser necessari afegir el 10% de dimetilsulfòxid (DMSO). Per amplificar els fragments de CnA $\alpha$ (2-348) es van emprar 0.6  $\mu$ M de cadascun dels encebadors i la barreja de reacció es va suplementar fins a 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

❖ Les condicions generals d'amplificació dels inserts van ser:

- 94°C 5 min
  - 94°C 30 s
  - x °C 30 s <sup>(\*)1</sup>
  - 72°C 30 s <sup>(\*)2</sup>
  - 72°C 10 min
  - 15°C  $\infty$
- } 30-35 cicles

<sup>(\*)1</sup> La T<sub>a</sub> de cada PCR va variar segons la seqüència de l'encebador emprat. El càlcul de les T<sub>a</sub> dels encebadors es va realitzar utilitzant la següent fórmula:

$$T_a(^{\circ}\text{C}) = 4^{\circ}\text{C}x(\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C}x(\text{A}+\text{T})$$

<sup>(\*)2</sup> Les Taq DNA polimerases emprades tenen diferent velocitat d'elongació. En general, per cada kb d'insert a amplificar l'elongació es feia durant 1 min.

El producte amplificat es va barrejar amb el tampó de càrrega 6x de DNA (Veure condicions de preparació, Capítol IV) i es va resoldre en una electroforesi en un gel d'agarosa amb el percentatge adient, en funció de la mida del fragment esperada. El revelat del gel es va fer per tinció amb bromur d'etidi. Seguidament, amb un bisturí es va tallar la banda d'interès i es va purificar mitjançant el sistema de purificació comercial de QIAGEN QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), seguint les instruccions del fabricant.

A continuació, i només amb aquells inserts que van ser clonats en el vector pBluescript SK<sup>+</sup>, es va digerir la banda purificada amb els enzims de restricció adients per tal

de donar lloc als extrems cohesius que permetessin la correcta lligació del fragment al vector.

❖ El protocol general de digestió de l'insert amplificat i purificat va ser:

- 30 µl de fragment amplificat purificat
- 2 U de l'enzim de restricció adient
- 3.5 µl del tampó 10X corresponent de l'enzim de restricció emprat
- Fins a 35 µl d'aigua destil·lada

La reacció va tenir lloc a la temperatura òptima de l'enzim de restricció que en general va ser a 37°C durant 3 h.

La purificació dels fragments amplificats i digerits es va realitzar mitjançant l'utilització del sistema comercial *QIAquick® PCR Purification Kit* de QIAGEN, seguint les instruccions del fabricant.

## **5.2. Obtenció de l'insert per digestió amb enzims de restricció**

❖ Condicions de les digestions dels inserts per fer els subclonats:

- 3 µg del plasmidi que conté l'insert que es vol subclonar
- 3 U de l'enzim de restricció
- 2 µl del tampó 10X corresponent a l'enzim de restricció utilitzat
- Fins a 20 µl d'aigua destil·lada

La reacció va tenir lloc a la temperatura òptima de l'enzim de restricció que en general va ser a 37°C durant 3 h.

## **5.3. Digestió i desfosforilació del vector**

❖ La digestió del vector va ser realitzada com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 5.2.

❖ Per la desfosforilació del vector s'emprà:

- 3 µg vector digerit completament
- 1 U de fosfatasa alcalina bovina intestinal (Roche)
- 4 µl de tampó 10X de la fosfatasa alcalina
- Fins a 40 µl d'aigua destil·lada



- Incubar a 37°C durant 30 min
- Afegir 1 U més de fosfatasa alcalina
- Incubar a 37°C durant 1 h i 30 min més o tota la nit
- Inactivar l'enzim a 65°C durant 15 min

#### 5.4. Lligació

- 50 ng de vector digerit i desfosforilat
- x ng d'insert adient <sup>(\*)</sup>
- 1.5 U de la T4 DNA Lligasa d' *E.coli* NM 989 acc. A Murray (Roche)
- 1.5 µl de tampó 10X de la T4 DNA Lligasa
- Fins a 15 µl d'aigua destil·lada
- Deixar a 4°C tota la nit

*(\*) Els ng d'insert per realitzar les lligacions es van calcular segons la fórmula (50 ng vector x Kb insert/Kb vector) x 6.*

### 6. PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

Per tal que les cèl·lules procariotes puguin internalitzar els plasmidis d'interès, cal que prèviament aquestes hagin adoptat la condició de “competència”. Existeixen diversos mètodes per la generació de cèl·lules competents i tot seguit es descriuen breument els emprats durant la realització d'aquest treball experimental.

#### 6.1. *E.coli* XL1-Blue electrocompetents

Aquest mètode està basat en el protocol descrit per Potter i col. (Potter et al., 1984):

- Preparar un cultiu tota la nit picant una colònia de *E.coli* XL1-Blue en 25 ml de LB amb tetraciclina (Veure condicions de preparació i d'ús, Capítol IV).
- Preparar 2 matraus de 2 L amb 500 ml de LB amb tetraciclina cadascun. Diluir 5 ml del cultiu obtingut durant tota la nit a cada matrau (dilució 1:100) per seleccionar els bacteris XL1-Blue i deixar a 37°C i 250 rpm.
- Créixer fins a una densitat òptica de 0.5-0.6 mesurada a una longitud d'ona de 600 nm.
- Refredar els matraus en gel durant 20-30 min.
- Centrifugar a la centrífuga Sorvall en tubs autoclavats durant 20 min a 4°C a 3600 g. Descartar el sobrenedant.
- Rentar dos cops les cèl·lules sedimentades amb 1 L d'aigua autoclavada pre-refredada a 4°C.

- Centrifugar 20 min a 4°C a 3600 g. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules sedimentades amb 16 ml de glicerol al 10% i pre-refredat a 4°C.
- Centrifugar 20 min a 4°C a 2800 g. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules sedimentades amb un volum de glicerol al 10% igual al volum obtingut de cèl·lules sedimentades. Aliquotar i congelar immediatament en neu carbònica. Emmagatzemar a -80°C.

### **6.2. *E.coli* XL1-Blue competents per xoc tèrmic**

Aquest mètode està basat en el protocol de Dagert i Ehrlich (Dagert and Ehrlich, 1979):

- Inicialment, aquest protocol és igual al descrit a l'apartat 6.1 amb l'única diferència que el volum de cèl·lules és només de 400 ml i que aquestes s'han de créixer fins a una densitat òptica de 0.375 mesurada a la longitud d'ona de 600 nm.
- Refredar el cultiu que estarà separat en tubs de 50 ml de 5-10 min en gel.
- Centrifugar durant 7 min a 4°C a 1600 g. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules sedimentades en 10 ml de la solució de CaCl<sub>2</sub> prèviament filtrada i a 4°C (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Centrifugar 5 min a 4°C a 1100 g. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules sedimentades en 10 ml de la solució de CaCl<sub>2</sub>.
- Incubar 30 min en gel.
- Centrifugar 5 min a 4°C a 1100 g. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules sedimentades de cada tub amb 2 ml de la solució de CaCl<sub>2</sub>. Aliquotar i congelar immediatament en neu carbònica. Emmagatzemar a -80°C.

### **6.3. *E.coli* BL21(DE3) pLysS competents per xoc tèrmic**

Aquest protocol és idèntic al de l'apartat 6.2. amb l'única diferència de que el cultiu de *E.coli* BL21(DE3)pLysS s'ha de seleccionar amb cloramfenicol (Veure condicions de preparació i d'ús, Capítol IV) enlloc de tetraciclina.

## **7. TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS**

Durant la realització d'aquest treball experimental s'han emprat diversos mètodes per introduir DNA plasmídic a cèl·lules procariotes, depenent de la soca de bacteris utilitzada i del posterior ús del DNA plasmídic incorporat.

### 7.1. Transformació de cèl·lules *E.coli* XL1-Blue per electroporació

- Pre-refredar un mínim de 5 min en gel les cubetes d'electroporació de Bio-Rad de 0.2 cm de pas de llum.
- Barrejar el DNA amb 50 µl de cèl·lules electrocompetents:
  - Plasmidi: Entre 50 pg-1 ng.
  - Lligacions: 2 µl dels 15 µl totals de lligació.
- Dispensar la barreja de DNA+cèl·lules a dins de les cubetes assegurant que es dipositi al fons de la cubeta i evitant la formació de bombolles.
- Programar l'electroporador Bio-Rad Gene Pulser II amb les següents condicions: Voltatge: 2.5 kV; Capacitància: 25 µF i Resistència: 200 Ω.
- Treure l'excés d'humitat de les cubetes amb un paper de cel·lulosa i immediatament electroporar les mostres.
- Habitualment, el temps d'electroporació correcte oscil·la entre 4.5-5.0 ms.
- Recollir les cèl·lules en 1 ml de LB sense antibiòtic prèviament atemperat a 37°C i passar-les a un tub eppendorf de 1.5 ml.
- Deixar els tubs a 37°C durant 1 h a 250 rpm.
- Sembrar en plaques de LB que continguin l'antibiòtic per seleccionar adient:
  - Plasmidi: Fer una dilució 1:100 del ml de cultiu i sembrar de 2-20 µl.
  - Lligacions: Sembrar tot el ml de cultiu.
- Deixar créixer les plaques en una estufa a 37°C tota la nit.

Les cubetes d'electroporaci

### 7.2. Transformació de cèl·lules *E.coli* XL1-Blue per xoc tèrmic

- Barrejar el DNA amb 100 µl de cèl·lules competents per xoc tèrmic:
  - Plasmidi: Utilitzar 10 ng.
  - Lligacions: La meitat de la lligació.
- Deixar 10 min en gel. Incubar a 42°C 90 s exactes. Deixar 2 min en gel.
- Afegir 900 µl de LB sense antibiòtic i deixar els tubs a 37°C durant 1 h a 250 rpm.
- Sembrar en plaques de LB que continguin l'antibiòtic per seleccionar adient:
  - Plasmidi: Sembrar de 50 a 200 µl de cultiu.
  - Lligacions: Sembrar tot el ml de cultiu.
- Deixar créixer les plaques en una estufa a 37°C tota la nit.

### 7.3. Transformació de cèl·lules *E.coli* BL21 (DE3)pLysS per xoc tèrmic

- Barrejar 100 µl de cèl·lules competents amb 2.5 µl de β-mercaptoetanol 1 M.

- Incubar 10 min en gel barrejant cada 2 min.
- Afegir 10 ng del plasmidi a transformar. Refredar 30 min en gel agitant cada 2-4 min. Incubar a 42°C 45 s exactes . Deixar 2 min en gel.
- Afegir 900 µl de LB sense antibiòtic i deixar els tubs a 37°C durant 1 h a 250 rpm.
- Sembrar de 30-100 µl de les cèl·lules transformades en plaques de LB que continguin els antibiòtics per seleccionar adients.
- Deixar créixer les plaques en una estufa a 37°C tota la nit.

Les cèl·lules transformades amb construccions fetes amb els plasmidis *pBluescript SK<sup>+</sup>* o *pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vector* es van sembrar en plaques d'agar a les que se'ls havia afegit prèviament 30µl de 100 mM IPTG (isopropil-β-D-galactòsid) i 30 µl de 2% X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolil-β-D-galactòsid, veure condicions de preparació, Capítol IV) per tal d'obtenir l'endemà colònies blanques i blaves que facilitessin la determinació de manera visual de les colònies positives.

## 8. VERIFICACIÓ DEL cDNA CLONAT

La caracterització de les colònies que havien incorporat el DNA plasmídic d'interès es va fer mitjançant dues aproximacions: PCR de cribratge per determinar quines colònies contenen l'insert i posterior digestió del DNA plasmídic per tal d'alliberar l'insert. Només en aquells casos en que es va determinar la presència de l'insert pels dos mètodes, es va realitzar la seqüenciació completa de la construcció per confirmar que el clonatge s'havia realitzat correctament.

### 8.1. PCR de cribratge de les colònies obtingudes i purificació del DNA

- Picar una colònia en 100 µl de LB més l'antibiòtic adient en una placa estèril de 96 pous. Incubar a 37°C durant 1 h.
- Les reaccions es van dur a terme amb la *Taq* DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* BM recombinant tal i com s'ha descrit prèviament en l'apartat 5.1 però en la meitat de volum (12.5 µl). A més, es van utilitzar com a motlle 2 µl de bacteris dels 100 µl dels cultius de la placa de 96 pous.
- Les condicions generals de les PCR de cribratge van ser les descrites a l'apartat 5.1. amb una temperatura d'anellament de 50°C i 35 cicles d'amplificació. En tots els casos es va fer servir un encebador que s'anellava al vector i un altre que s'anellava a l'insert, per seleccionar únicament les colònies que duien l'insert orientat correctament.
- El producte amplificat es va resoldre per electroforesi en un gel d'agarosa amb el percentatge adient en funció de la mida del fragment esperada i posterior tinció amb bromur d'etidi.

- Els 98 µl restants de cultiu de les colònies positives es van inocular en 5 ml de LB amb els antibiòtics necessaris i es van fer créixer a 37°C tota la nit a 250 rpm.
- L'endemà, del cultiu crescut a saturació es va extreure el DNA plasmídic (5-25 µg) utilitzant el sistema comercial *QIAprep® Spin Mini prep Kit* seguint les instruccions del fabricant.
- Quantificar el DNA per espectrofotometria a la longitud d'ona de 260 nm emprant l'aparell NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Nucliber, Delaware, USA).

## 8.2. Digestió de les colònies positives

Les condicions de digestió són idèntiques a les descrites a l'apartat 5.2 amb l'única particularitat de que en aquest cas sempre es van fer digestions de plasmidis que alliberessin com a mínim 100 ng d'insert, per a que pogués ser visualitzat fàcilment per agarosa.

## 8.3. PCR de seqüenciació del DNA

❖ Les reaccions es van dur a terme habitualment en 10 µl de volum final amb les següents condicions:

- Entre 150-200 ng del plasmidi
- 1 o 2 µl de la barreja comercial *Big dye 3.1® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Fosters City, CA, USA)
- 2 µl de Tampó 5X de *Big dye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer*
- 0.32 µM del corresponent encebador
- Fins a 10 µl d'aigua destil·lada.

❖ El protocol general d'amplificació va ser:

- 96°C 30 s
  - 50°C 30 s
  - 60°C 1 min
  - 15°C ∞
- } 30 cicles

En cas de que l'insert tingués un alt contingut en bases nitrogenades G i C, es va afegir un 5% de DMSO a la barreja de reacció i es van fer servir les següents condicions d'amplificació:

- 96°C 10 min
  - 98°C 30 s
  - 50°C 30 s
- } 30 cicles

- 60°C 1 min
- 15°C ∞
- ❖ Protocol de purificació de les mostres:

Per tal d'eliminar els nucleòtids fluorescents i no fluorescents no incorporats es va realitzar la purificació de les mostres amb unes columnes de gel filtració amb Sephadex G-50 (Veure condicions de preparació, Capítol IV):

- Omplir la columna amb Sephadex G-50 i centrifugar a 2000 g durant 1 min per treure l'excés d'aigua.
- Afegir pel centre de la resina 10 µl d'aigua destil·lada i centrifugar a 2000 g durant 1 min.
- Afegir pel centre de la resina els 10 µl de la reacció de seqüenciació. Centrifugar a 2000 g durant 1 min i recollir el través.
- Liofilitzar i enviar a seqüenciar al Servei de Seqüenciació de l'IDIBELL.

#### 8.4. Purificació del DNA a gran escala

Per tal d'obtenir majors quantitats de DNA (100-500 µg) es van realitzar preparacions de DNA a gran escala utilitzant el sistema comercial *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* seguint el protocol de la casa comercial. La font de DNA s'obtenia fent créixer tota la nit un cultiu líquid de 100 ml de LB amb l'antibiòtic adient, a on s'hi havia inoculat 100-200µl d'un cultiu fresc crescut durant 8 h. Quan es van necessitar preparacions de DNA lliures d'endotoxines per tal de minimitzar la toxicitat d'alguns plasmidis al transfectar cèl·lules eucariotes es va emprar el sistema comercial *EndoFree® Plasmid Maxi Kit*, seguint les instruccions del fabricant.

### 9. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ A GLUTATIÓ-S-TRANSFERASA (GST)

L'expressió de proteïnes de fusió a GST en un sistema procariota permet obtenir grans quantitats de la proteïna d'interès de manera senzilla i ràpida. Durant la realització d'aquest treball experimental s'han dut a terme dos tipus d'induccions de proteïna:

- a petita o mitjana escala: es van expressar les proteïnes GST i GST-RCAN3-2(178-203) per realitzar assaigs de *pull down* que permetessin analitzar la capacitat d'interaccionar del producte IDI3A (identificat a partir del cribratge d'una quimioteca, Veure Capítol III) amb Cn. També es va expressar la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(2-144), que correspon a la regió N-terminal de la proteïna RCAN3-2, per immunitzar ratolins i generar un anticòs anti-RCAN3-2.

- a gran escala: es van expressar les proteïnes GST-CnA $\alpha$ (2-347)mutada, GST-CnA $\alpha$ (2-348)wt i GST-CnA $\alpha$ (2-348)mutada, els inserts de les quals corresponen a diferents fragments de la CnA $\alpha$  humana, per realitzar els assaigs d'anisotropia de fluorescència.

L'expressió de totes aquestes proteïnes de fusió a GST es va realitzar seguint les indicacions del fabricant (Amersham Biosciences).

❖ El protocol seguit per optimitzar les expressions de les diverses proteïnes de fusió a GST va ser el següent:

- Induir la producció de la proteïna de fusió variant la temperatura (25°C o 37°C), el temps (des d'1 h a tota la nit) i la concentració d'IPTG (de 0.1mM a 0.5 mM).
- Determinar la solubilitat de la proteïna expressada per electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i posterior tinció amb la solució fixadora colorant Coomassie Blue (Ambdós protocols es descriuran en detall a l'apartat 9.3).
- Identificar la colònia millor productora de la proteïna de fusió a GST.

A la Taula 5 es detallen les condicions finals optimitzades d'inducció i d'expressió per a cada proteïna de fusió.

**Taula 5.** Taula resum de les condicions d'expressió optimitzades per les diferents proteïnes de fusió a GST emprades en la realització d'aquest treball experimental.

|                                | Condicions sonicat <sup>(*)</sup> | [IPTG] | Temperatura | Temps       |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------|-------------|-------------|
| GST                            | 18 intensitat 20 s (x2 o x3)      | 0,1 mM | 37°C        | 3 h         |
| GST-RCAN3-2(2-144)             | 18 intensitat 20 s (x2)           | 1 mM   | 25°C        | Tota la nit |
| GST-RCAN3-2(178-203)           | 18 intensitat 20 s (x2)           | 0,1 mM | 37°C        | 3 h         |
| GST-CnA $\alpha$ (2-347)mutada | 18 intensitat 20 s i 15 s         | 0,5 mM | 25°C        | Tota la nit |
| GST-CnA $\alpha$ (2-348)wt     | 18 intensitat 20 s i 15 s         | 0,5 mM | 37°C        | Tota la nit |
| GST-CnA $\alpha$ (2-348)mutada | 18 intensitat 20 s i 15 s         | 0,5 mM | 37°C        | Tota la nit |

(\*) Entre parèntesi s'indica el número de vegades que es sonicaven cadascuna de les mostres.

### 9.1. Expressió i purificació de la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(2-144) i digestió amb la proteasa Factor Xa

- Transformar el plasmidi *pGEX-5X-RCAN3-1,2,3,4,5(2-432)*, que codifica per la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(2-144), en *E.coli* BL21(DE3) pLysS per xoc tèrmic.
- Créixer fins a una densitat òptica de 0.6 mesurada a una longitud d'ona de 600 nm.
- Induir l'expressió de la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(2-144) com s'indica a la Taula 5.

- Centrifugar a temperatura ambient durant 10 min a velocitat màxima.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb el tampó de lisi de bacteris (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Sonicar les mostres a la intensitat i temps indicats a la Taula 5 i després centrifugar a 4°C 15 min a velocitat màxima.
- Rentar les boles de Glutatió-*Sepharose* (Amersham biosciences) un mínim de dues vegades amb tampó fosfat salí (PBS 1X) per eliminar l'etanol que duen com a preservant. Resuspendre les boles amb un volum de PBS 1X igual al volum final de les boles obtingut (Glutatió-*Sepharose* al 50%).
- Seguidament, purificar la proteïna emprant les boles durant 1-2 h a 4°C seguint les instruccions del fabricant.
- Afegir totes les boles dins una columneta i rentar-les amb el tampó de la proteasa Factor Xa (Amersham Biosciences) (Veure condicions de preparació, Capítol IV). Afegir el Factor Xa que digerirà la proteïna GST-RCAN3-2(2-144) per tal de separar el GST i només eluir la proteïna RCAN3-2(2-144) per immunitzar els ratolins. Es considera que 1 U de Factor Xa digereix el 90% de 100 µg d'una proteïna de fusió unida a GST.
- La digestió es va dur a terme durant 2-3 h a temperatura ambient.
- Eluir la proteïna RCAN3-2(2-144) purificada per centrifugació durant 5 min a 500 g.
- Quantificar la proteïna a l'espectrofotòmetre a 280 nm.

## 9.2. Expressió i purificació de diverses proteïnes de fusió GST-CnA $\alpha$ i digestió amb la proteasa PreScission

El protocol que es va seguir és molt similar al descrit a l'apartat anterior però inclou algunes petites particularitats:

- Transformar les diverses construccions de *pGEX-6P-CnA $\alpha$* .
- Purificar les proteïnes seguint el protocol facilitat pel Dr. Patrick Hogan amb el que havien optimitzat l'obtenció de la proteïna GST-CnA $\alpha$ (2-347)mutada (Roehrl et al., 2004).

Aquest protocol consisteix en:

- Resuspendre el sediment cel·lular amb el tampó de lisi de bacteris adient (Veure condicions de preparació, Capítol IV) i deixar agitant durant 30 min a temperatura ambient per permetre actuar a la lisozima.
- Sonicar les mostres tal i com es detalla a la Taula 5, després afegir 1% Tritó X-100 i agitar a 4°C durant 30 min. Finalment, realitzar 3 cicles de congelació a -80°C/descongelació en aigua-gel.
- Purificar la proteïna emprant les boles de Glutatió-*Sepharose* durant 4 h a 4°C.



- Afegir les boles a una columna i rentar-les 2 cops amb el tampó de la proteasa PreScission (Amersham Biosciences) (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Després, rentar les boles 8 cops més amb el mateix tampó però sense contenir els inhibidors de proteases (aprotinina, leupeptina, i fluorur de fenil-metil-sulfonílic (PMSF)).
- Digerir amb la proteasa PreScission a 4°C tota la nit en agitació. Es considera que 1 U de proteasa PreScission digereix el 90% de 100 µg d'una proteïna de fusió unida a GST.
- L'endemà eluir la CnA $\alpha$  purificada per gravetat a 4°C i rentar les boles amb dos volums del tampó de la proteasa per acabar d'eluir tota la proteïna digerida.

### 9.3. SDS-PAGE (electroforesi en gel de poliacrilamida) i tinció del gel amb Coomassie Blue

Una vegada obtingudes les mostres de proteïna purificada es van bullir a 98°C durant 10 min amb tampó de Laemmli (Veure condicions de preparació, Capítol IV). Degut a l'acció del  $\beta$ -mercaptoetanol i del dodecil sulfat sòdic (SDS) que conté aquest tampó, les proteïnes es desnaturalitzen i es carreguen negativament, de manera proporcional a la massa de cada proteïna. En aquestes condicions, si les mostres es resolen en un gel de SDS-PAGE, la diferent migració de cada proteïna estarà directament relacionada únicament amb la seva massa molecular.

❖ El protocol general emprat va ser el següent:

- Preparar un gel de poliacrilamida discontinu format per un gel concentrador, de porus ample que permetrà que totes les mostres comencin l'electroforesi des del mateix punt, i un gel separador, que permetrà resoldre les proteïnes segons el seu pes molecular (Veure condicions de preparació, Capítol IV). En general, el percentatge de poliacrilamida del gel separador utilitzat va ser del 10%.
- Resoldre les mostres a 140 V durant 1h.
- Tenyir els gel amb la solució fixadora colorant de proteïnes Coomassie Blue durant 45 min.
- Eliminar l'excés de tinció amb la solució decolorant I fent un únic rentat curt.
- Acabar de decolorar del tot el gel amb múltiples rentats amb la solució decolorant II (Veure condicions de preparació de les tres solucions emprades, Capítol IV).

## CAPÍTOL II: MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES

### ▪ MATERIALS

#### 10. LÍNIES CEL·LULARS

- Jurkat clon E6-1, leucèmia aguda de cèl·lules T, i HeLa, carcinoma epitelial de cervix humà, cedides amablement pel Dr. José Aramburu.
- HuT 78, línia cel·lular de limfoma T humà, cedida amablement pel Dr. Enric Espel (Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).
- COS-7, fibroblasts de ronyó de mico verd Africà transformats amb antigen T de SV40, adquirida de l'*European Collection of Cell Cultures*.
- HEK 293T, cèl·lules de ronyó embrionari humà, cedida amablement pel Dr. Lluís Espinosa.
- U-2 OS, línia cel·lular d'osteosarcoma humà, cedida amablement per la Dra. Mar Orzáez (Laboratorio de Péptidos y Proteínas, Centro de Investigación Príncipe Felipe, València).

#### 11. MEDIS DE CULTIU

Les línies cel·lulars Jurkat i HuT 78 es van créixer en medi RPMI que contenia Glutamax (Invitrogen Corporation) suplementat amb un 10% (v/v) de sèrum boví fetal (FBS), 100 unitats/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina.

Totes les altres línies es van créixer en medi DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Invitrogen Corporation) suplementat amb un 10% (v/v) de sèrum boví fetal (FBS), 100 unitats/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 2 mM de glutamina.

### ▪ MÈTODES

#### 12. RT-PCR SEMIQUANTITATIVA DEL RNA TOTAL

Aquest tipus d'assaig es va utilitzar per determinar els nivells endògens de mRNA de diferents transcrits dels gens *RCAN1* i *RCAN3* en limfòcits T humans, així com per determinar la capacitat inhibidora del producte IDI3A (identificat a partir del cribratge d'una quimioteca, Veure Capítol III) vers l'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT.

##### 12.1. Determinació dels nivells de mRNA dels transcrits de *RCAN1* i *RCAN3*

Aquests assaigs es van realitzar amb cèl·lules Jurkat i HuT 78 en tres condicions:

- 1.- Cèl·lules no estimulades: tractades amb els vehicles dels diferents estímuls.

- 2.- Cèl·lules estimulades mitjançant un increment en la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$ :
- a través del receptor de cèl·lules T (TCR) emprant 1µg/ml anti-CD3 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) immobilitzat a la placa de cultiu i 1µg/ml anti-CD28 (Sigma-Aldrich) soluble.
  - mitjançant l'administració de 1 µM ionomicina (Sigma-Aldrich) i 20 nM 4-α-forbol 12-miristat 13 acetat (PMA, Sigma-Aldrich).
- 3.- Cèl·lules inhibides mitjançant l'administració d'inhibidors de Cn: afegir 1 µM de ciclosporina A (CsA, cedida per Novartis Pharma S.A.) o FK506 (cedida per Fujisawa USA Inc.) 30 min abans de la ionomicina+ PMA.

- Estimular fins a un màxim de 6 h a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> recollint mostra als temps indicats.
- Centrifugar les mostres a 300 g durant 10 min i descartar el sobrenedant. Congelar les cèl·lules sedimentades immediatament en neu carbònica i després emmagatzemar a -80°C.

La confirmació de l'estimulació dels limfòcits es va fer mitjançant l'anàlisi per PCR dels nivells d'expressió de la *IL2*.

### **12.2. Determinació dels nivells de mRNA de diverses citoquines dependents de NFAT en presència del producte IDI3A**

El protocol seguit és idèntic al descrit a l'apartat 12.1 amb petites particularitats:

- Aquests assaigs només es van realitzar amb cèl·lules Jurkat.
- Les cèl·lules van ser tractades amb DMSO o concentracions creixents (de 0.1 a 100 µM) del producte IDI3A durant tota la nit abans de realitzar els estímuls.
- L'estimulació es va dur a terme amb ionomicina+PMA durant 4 h.

### **12.3. Extracció del RNA total i retro-transcripció (RT) del RNA**

- L'extracció del RNA total es va fer amb el reactiu comercial *RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)*, seguint les indicacions del fabricant.
- Resoldre les mostres mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a 80 V durant 10 min per confirmar la seva integritat.
- Determinar la concentració del RNA mitjançant espectrofotometria mesurant a la longitud d'ona de 260 nm.
- Retrotranscriure a cDNA d'1-2 µg del RNA total emprant encebadors de 6 nucleòtids de seqüència a l'atzar i l'enzim *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (mutant puntual de la transcriptasa reversa provinent del virus de la leucèmia murina de Moloney) seguint el protocol descrit per la casa comercial (Invitrogen Corporation).

## 12.4. PCR dels gens d'interés

El cDNA resultant es va amplificar per PCR emprant encebadors específics a diferent número de cicles per tal d'assegurar que es treballava en la fase exponencial d'amplificació i poder així comparar els diferents nivells d'expressió dels gens analitzats.

❖ La barreja de PCR es va realitzar tal i com s'ha descrit a l'apartat 5.1 emprant de 100-200 ng de cDNA com a motlle.

❖ Les condicions d'amplificació pels diferents gens analitzats estan detallades a la Taula 6.

**Taula 6.** Taula resum de les condicions d'amplificació utilitzades per la realització de les RT-PCR dels diferents transcrits analitzats.

| Transcrit amplificat   | Encebadors                 | Seqüències  | Localitzador encebador | PCR (°C) | Cicle | Mida (pb) |
|------------------------|----------------------------|---|------------------------|----------|-------|-----------|
| <i>RCAN1-1</i>         | H3E1.1 M2<br>hDSCR1-E5R1   | 5'-GAGGAGGTGGATCTGCAC-3'<br>5'-AGTCTTATGCAGCTGGAGC-3'                   | Exó 1<br>Exó 5         | 58       | 26    | 222       |
| <i>RCAN1-4</i>         | hDSCR1-E4D1<br>hDSCR1-E5R1 | 5'-TCCCTGATTGCCTGTGTGG-3'<br>5'-AGTCTTATGCAGCTGGAGC-3'                  | Exó 4<br>Exó 5         | 58       | 26    | 189       |
| <i>RCAN3-1,2,3,4,5</i> | RCAN3-FW<br>RCAN3-RV       | 5'-CGTAGAATTCTGCTGAGGGACACTATG-3'<br>5'-GGTACTTAAGTCACAGCGCAATCAAAGG-3' | Exó 2<br>Exó 5         | 58       | 26    | 726       |
| <i>GAPDH</i>           | GAPDH FW<br>GAPDH RV       | 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'<br>5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'                | Exó 1<br>Exó 6         | 58       | 26    | 497       |
| <i>CSF2</i>            | CSF2-215FW<br>CSF2-350RW   | 5'-GAAATGTTTGACCTCCAGGAGC-3'<br>5'-CAGGAAGTTTCCGGGGTTGG-3'              | Exó 2/3<br>Exó 3/4     | 67       | 30    | 155       |
| <i>IL2</i>             | IL-2D<br>IL-2R             | 5'-CAGCTTCAGTGTCTAGAAGAA-3'<br>5'-ACAATGGTTGCTGTCTCATCT-3'              | Exó 3<br>Exó 4         | 58       | 26    | 182       |
| <i>IL3</i>             | IL3-206FW<br>IL3-515RW     | 5'-GCCTTTGCTGGACTTCAACAAC-3'<br>5'-GAGAACGAGCTGGACGTTGG-3'              | Exó 1/2<br>Exó 5       | 62       | 30    | 329       |
| <i>TNF</i>             | TNF391FW<br>TNF581RW       | 5'-CCAGGCAGTCAGATCATCTTCTC-3'<br>5'-AGCTGGTTATCTCTCTCAGCTCCA-3'         | Exó 2/3<br>Exó 4       | 58       | 30    | 150       |

Els productes amplificats corresponents a les citoquines van ser resoltos en gel d'agarosa i posterior tinció amb bromur d'etidi.

Pel que fa als diferents transcrits de *RCAN1* i *RCAN3* es van resoldre com es descriu a continuació:

❖ Protocol d'electroforesi en gel d'acrilamida-bisacrilamida en condicions no desnaturalitzants:

- Barrejar les mostres amb el tampó de càrrega no desnaturalitzant (Veure condicions de preparació, Capítol IV)
- Preparar un gel d'acrilamida-bisacrilamida al 6% (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Abans de carregar les mostres, engegar la carrera a 150 V durant 15 min per assegurar la distribució homogènia dels ions a tota la superfície del gel.
- Córrer les mostres a 180 V la distància que sigui necessària per separar correctament les bandes.

❖ Protocol de revelat per tinció de plata:

- Un cop acabada la carrera de les mostres, deixar el gel en 10% etanol durant un mínim de 10 min.
- Tot seguit, posar el gel en 1% d'àcid nítric durant 3 min exactes.
- Fer dos rentats amb aigua destil·lada.
- Posar el gel en 12 mM AgNO<sub>3</sub> durant 20 min preservant-lo de la llum.
- Fer dos rentats ràpids amb aigua destil·lada.
- Tenyir el gel amb 274 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (suplementat amb el 0.05% de formaldehid) fins que apareguin les bandes i després aturar la reacció amb 10% àcid acètic durant 5-10 min.
- Finalment, rentar amb aigua destil·lada.
- Col·locar el gel a sobre d'un tros de paper Whatman i cobrir amb una transparència.
- Assecar el gel en un assecador de gels connectat a una bomba de buit durant 40 min a 80°C.

### 13. TRANSFECCIÓ DE DNA PLASMÍDIC EN CÈL·LULES EUCARIOTES

Durant la realització d'aquest treball experimental s'han utilitzat diversos mètodes de transfecció en funció de la línia cel·lular emprada.

#### 13.1. Transfecció del DNA plasmídic per electroporació

Aquest mètode es va emprar per transfectar cèl·lules Jurkat i HuT 78 i està basat en el protocol descrit al 1988 per Bottger (Bottger, 1988).

En el nostre cas es van emprar tres aparells electroporadors diferents: Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), Electro Cell Manipulator 600 i 630 (BTX, San Diego, CA, USA). Les condicions d'electroporació optimitzades en cada cas es troben recollides en la següent taula:

**Taula 7.** Taula resum de les condicions d'electroporació optimitzades segons l'aparell emprat.

|                             | Gene Pulser II | ECM 630 <sup>(1*)</sup> | ECM 600 <sup>(2*)</sup> |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|
| Número de cèl·lules         | 20 milions     | 20 milions              | 20 milions              |
| Volum de transfecció (µl)   | 500            | 500                     | 500                     |
| Plasmidi (µg)               | 20             | 20                      | 20                      |
| Voltatge (V)                | 280            | 260                     | 260                     |
| Capacitància (µF)           | 975            | 1050                    | 1050                    |
| Resistència (Ω)             | 500            | None                    | 480                     |
| Temps d'electroporació (ms) | 22-26          | 25-30                   | 23-27                   |

<sup>(1\*)</sup> i <sup>(2\*)</sup> Els assaigs amb l'aparell ECM 630 es van dur a terme al Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia (ICO-IDIBELL) de Barcelona amb personal del grup que dirigeix el Dr. Ramon Alemany. Els assaigs fets amb l'ECM 630 es van dur a terme al Laboratorio de Bioinvestigación de l'empresa Merck Farma y Química del Parc Científic de Barcelona sota la supervisió del Dr. Ramon Messeguer. Les cubetes d'electroporació es reutilitzaven rentant-les amb una solució de 0.01% (v/v) SDS durant tota la nit i posteriorment s'esterilitzaven amb òxid d'etilè.

❖ El protocol general d'electroporació va consistir en:

- Comptar les cèl·lules i centrifugar-les a 300 g durant 10 min descartant el sobrenedant.
- Rentar el sediment cel·lular amb 5 ml de medi sense FBS i tornar a centrifugar a 300 g durant 10 min descartant el sobrenedant.
- Resuspendre el sediment cel·lular amb els 500 µl de medi sense FBS, barrejar-lo amb el DNA plasmídic i dispensar-lo dins de la cubeta de 0.4 cm de pas de llum, evitant la formació de bombolles.
- Electroporar segons les condicions detallades a la Taula 7 en cada cas.
- Recuperar les cèl·lules amb medi complet sota campana per mantenir en tot moment l'esterilitat.
- Incubar a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant tota la nit.

Les cèl·lules Jurkat transfectades amb els aparells ECM 600 i ECM 630 van ser les que posteriorment es van utilitzar per realitzar els assaigs de PCR a temps real amb les targetes Micro Fluídiques dels nivells de transcripció de diverses citoquines. Els plasmidis que es van utilitzar en aquests experiments van ser purificats amb el sistema comercial *EndoFree*<sup>®</sup> *Plasmid Maxi Kit* QIAGEN per tal de minimitzar la toxicitat causada pels plasmidis.

### 13.2. Transfecció del DNA plasmídic amb DEAE-dextran

Aquest mètode es va emprar per transfectar cèl·lules COS-7 i està basat en el protocol descrit al 1987 per Aruffo i Seed (Aruffo and Seed, 1987):

- Sembrar 300.000 cèl·lules per placa P60.
- L'endemà, rentar les plaques amb DMEM sol i deixar a l'incubador mentre es prepara el medi de transfecció.
- Medi de transfecció:
  - 2 ml de DMEM complet suplementat només amb el 2.5% de FBS
  - 4 µg de plasmidi
  - 20 µl de DEAE-dextran d'una solució mare a 10 mg/ml (100X) en PBS que haurà estat agitada per inversió just abans d'afegir.
- Aspirar el DMEM de cada placa i afegir el medi de transfecció que haurà d'haver estat agitat just abans d'afegir. Incubar 3h i 30 min a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
- Afegir 2 µl de cloroquina d'una solució mare a 100 mM (1000X) en PBS per placa. Incubar 1 h i 45 min més a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
- Aspirar el medi i dispensar 4 ml de DMEM solament suplementat amb el 10% DMSO. Incubar 2 min exactes a temperatura ambient.
- Rentar amb 4 ml de DMEM sense cap suplement.
- Afegir 3 ml de DMEM complet amb el 10% de FBS i incubar a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

El protocol aquí descrit està optimitzat per plaques P60 de 21 cm<sup>2</sup> de superfície. En el cas de fer servir altres plaques, caldrà calcular proporcionalment en funció de l'àrea la quantitat de cèl·lules i dels diferents components a utilitzar.

### 13.3. Transfecció el DNA plasmídic amb fosfat càlcic

Aquest mètode es va utilitzar per transfectar cèl·lules HEK 293T i U-2 OS i està basat en el protocol descrit al 1987 per de Chen i Okayama (Chen and Okayama, 1987):

- Sembrar 500.000 cèl·lules HEK 293T per pou en plaques P6.
- L'endemà, afegir 1.85 ml de DMEM complet i incubar a 37°C durant 2-4 h.
- Per una placa P6, utilitzar 150 µl de medi de transfecció i de 3-4.5 µg de DNA.
- Preparar dues solucions:
  - Solució A: - aigua milliQ estèril
  - barreja de DNA (plasmídic+DNA d'alt pes molecular)
  - 7.5 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M estèril

} } Barrejar

- Solució B: -75 µl de tampó HeBS estèril amb el pH òptim de transfecció (Veure condicions de preparació, Capítol IV).

- Dispensar la solució A dins la B fent bombolleig constantment i després acabar de barrejar enèrgicament durant 5 s.
- Incubar a temperatura ambient durant 20 min.
- Dispensar els 150 µl de medi de transfecció gota a gota agitant constantment la placa per evitar l'acidificació local del medi de cultiu.
- Incubar a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> tota la nit.
- L'endemà al matí, aspirar el medi i dispensar 3 ml de DMEM complet fresc.

El protocol aquí descrit està optimitzat per plaques P6 de 9.4 cm<sup>2</sup> d'àrea. En el cas de fer servir altres plaques, caldrà calcular proporcionalment en funció de l'àrea les quantitats de cèl·lules i dels diferents components a utilitzar.

#### 14. CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

Per tal de poder determinar *in vivo* les interaccions RCAN1-1-CnA i RCAN3-2-Cn, respectivament, es van realitzar assaigs de co-immunoprecipitació (co-IP).

Aquest protocol està basat en el fet de que la proteïna G té avidesa per unir-se a la fracció constant de diferents IgG en funció del seu isotip. L'utilització de boles de Proteïna G-*Sepharose* que tinguin unit un anticòs que reconegui la proteïna d'interès, ens permetrà reconèixer aquesta proteïna així com aquelles altres proteïnes que estiguin interaccionant amb ella.

##### 14.1. Protocol de co-IP RCAN1-1-CnA

❖ El protocol que es detalla a continuació va permetre identificar la interacció RCAN1-1-CnA tant a nivell basal com en condicions de sobreexpressió de RCAN1-1:

- Preparar un tampó de lisi per obtenir un extracte proteic soluble de cèl·lules Jurkat sense transfectar o transfectades amb *pHA-RCAN1-1* (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Rentar les boles de Proteïna G-*Sepharose* (Amersham biosciences) un mínim de dues vegades amb PBS 1X per eliminar l'etanol que duen com a preservant. Resuspendre les boles amb un volum de tampó de lisi igual al volum final de les boles obtingut (Proteïna G-*Sepharose* al 50%).



- Barrejar 40 µl de boles de Proteïna G-Sepharose G al 50% amb 160 µl de tampó de lisi i amb l'anticòs amb el que es vol realitzar la immunoprecipitació. Per detectar la interacció RCAN1-1-CnA es van emprar: anti-CnA de ratolí (1.5 µg), anti-HA.11 de ratolí (6 µg, Covance BabCO, Berkeley, CA, USA) i anti-RCAN1-1 de conill (2 µg, (Genesca et al., 2003)).
- Barrejar en un agitador orbital a temperatura ambient durant 4 h.
- En paral·lel, centrifugar les cèl·lules sense transfectar o transfectades durant 24 h a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> a 400 g durant 5 min a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i rentar dues vegades amb PBS 1X fred.
- Treure el darrer sobrenedant i lisar les cèl·lules sedimentades amb el tampó de lisi.
- Barrejar un mínim de 30 min a 4°C.
- Centrifugar a velocitat màxima durant 10 min a 4°C. El sobrenedant serà l'extracte proteic soluble.

En general, les co-IP es van fer amb 1 mg d'extracte proteic soluble donat que es volien visualitzar proteïnes endògenes.

- Separar un volum adient inicial d'extracte (*input*) i bullir-lo amb tampó Laemmli, tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 9.3.
- Utilitzar una alíquota d'aquest extracte proteic soluble per mesurar la concentració de proteïna mitjançant un assaig colorimètric utilitzant el sistema comercial comercial *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Rockford, IL, USA), seguint les instruccions del fabricant.
- Barrejar la resta de l'extracte proteic soluble amb els 200 µl de boles de Proteïna G-Sepharose unida a l'anticòs en tampó de lisi i deixar tota la nit en un agitador orbital a 4°C.
- L'endemà, centrifugar les mostres a 500 g durant 5 min a 4°C.
- Separar un volum adient del sobrenedant (través) i bullir-lo amb tampó Laemmli. Descartar la resta de sobrenedant.
- Rentar les boles un mínim de dues vegades amb tampó de lisi.
- Finalment, resuspendre les boles amb tampó Laemmli i bullir.

#### 14.2. Protocol de co-IP RCAN3-2-CnA

El protocol general va ser molt semblant a l'emprat per determinar la interacció RCAN1-1-CnA però amb petites modificacions:

- Transfectar cèl·lules HEK 293T amb *pHA-RCAN3-1,2,3,4,5*.
- El tampó de lisi utilitzat no incloïa l'1% (v/v) Tritó X-100 sinó 10 mM 3[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) o 1% (v/v) IGEPAL.
- Els anticossos emprats per immunoprecipitar van ser l'anti-RCAN3-2 generat al laboratori, l'anti-CnA i l'anti-HA, tots tres generats a ratolí.

- Les boles de Proteïna G-*Sepharose* es van unir a l'anticòs anti-RCAN3-2 durant 4 h a temperatura ambient i es van incubar amb l'extracte proteic soluble només durant 2 h a 4°C enlloc de tota la nit a 4°C, que són les condicions emprades tant per l'anti-CnA com per l'anti-HA.

## 15. PULL DOWN

Aquesta tècnica es va emprar per determinar si el producte IDI3A (identificat a partir del cribatge d'una quimioteca, Veure Capítol III) era capaç de competir la interacció de la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(178-203) i CnA.

El protocol emprat es bastant similar al protocol de la co-IP descrit a l'apartat anterior, tot i que enlloc d'utilitzar boles de Proteïna G-*Sepharose* es van emprar boles de Glutatió-*Sepharose 4B*.

❖ En detall, el protocol de *pull down* dut a terme va ser el següent:

- Induir l'expressió de les proteïnes GST i GST-RCAN3-2(178-203) seguint les indicacions recollides a la Taula 5 i recollir els cultius cel·lulars centrifugant durant 10 min a velocitat màxima.
- Eliminar el sobrenedant i congelar les cèl·lules sedimentades immediatament en neu carbònica.
- Créixer les cèl·lules Jurkat en presència de 50  $\mu$ M del producte IDI3A o DMSO, que és el diluent del producte IDI3A, a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant tota la nit.
- L'endemà, purificar les proteïnes recombinants tal i com es descriu a l'apartat 9.1 però sense digerir amb Factor Xa, de tal manera que tant la proteïna GST com la GST-RCAN3-2(178-203) quedin retingudes a les boles de Glutatió-*Sepharose*. L'extracció de proteïnes tant de GST com de GST-RCAN3-2(178-203) es va fer a partir de sediments cel·lulars obtinguts a partir de 30 ml de cultiu.
- Rentar les boles 3 cops amb el mateix tampó de lisi de bacteris amb el que s'han extret les proteïnes de fusió i finalment resuspendre les boles amb el mateix volum de tampó de lisi (Veure condicions de preparació, Capítol IV).
- Preparar un altre tampó de lisi per obtenir un extracte proteic soluble de cèl·lules Jurkat que després es farà servir per fer el *pull down* (Veure condicions de preparació, Capítol IV). Per cada punt que es va analitzar, es van lisar 30 milions de Jurkat.
- Lisar les cèl·lules Jurkat durant 30 min com a mínim a 4°C en un agitador orbital. Centrifugar 10 min a velocitat màxima a 4°C i agafar el sobrenedant que contindrà l'extracte proteic soluble.
- Separar un volum de sobrenedant adient (*input*) i bullir-lo amb tampó Laemmli.
- La resta d'extracte proteic soluble es va barrejar amb diferents volums de boles que contenen les proteïnes purificades GST i GST-RCAN3-2(178-203). Aquests volums de boles de

Glutatió-Sepharose analitzats van ser de 20 µl, 10 µl i 1 µl, els quals corresponien a les proporcions considerades com a 1, 1/2 i 1/20, respectivament <sup>(\*)</sup>. Finalment, afegir 100 µM del producte IDI3A o el volum corresponent de DMSO.

- Incubar en un agitador orbital durant 2 h a 4°C.
- Centrifugar a 500 g durant 5 min a 4°C i separar un volum adient de sobrenedant (través) que també es va bullir amb tampó Laemmli.
- Rentar 2 cops les boles amb el tampó de lisi de les Jurkat. Descartar el sobrenedant.
- Bullir les boles amb tampó Laemmli.

<sup>(\*)</sup> Donat que les proporcions 1/2 i 1/20 van suposar haver de treballar amb volums de boles petits, un cop passades les 2 h d'incubació es va afegir el volum necessari de boles de Glutatió-Sepharose sense cap proteïna unida a elles que ens permetés igualar el volum final de boles en totes les condicions, per facilitar les centrifugacions posteriors i no perdre la mostra.

## 16. TRANSFERÈNCIA DE WESTERN I ANÀLISI AMB ANTICOSSOS ESPECÍFICS

Tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 9.3, les proteïnes una vegada desnaturalitzades es poden resoldre en una electroforesi amb gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzant (SDS-PAGE). A l'apartat 9.3 s'ha descrit el protocol de tinció del gel amb Coomassie Blue, però alternativament, les proteïnes del gel es poden transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i immunodetectar-les emprant anticossos específics.

Aquesta metodologia ens va permetre detectar les diferents proteïnes en els assaigs de co-IP i la presència de CnA en els *pull down*. Pel que fa a les proteïnes GST i GST-RCAN3-2(178-203), aquestes van ser detectades mitjançant tinció de la membrana de nitrocel·lulosa amb solució colorant Ponceau S. A continuació es detallen tots els protocols emprats.

### ❖ Protocol general de transferència de *Western*:

- Realitzar l'electroforesi de les mostres tal i com s'ha descrit a l'apartat 9.3.
- Transferir les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa durant 1 h a 4°C mantenint constant la intensitat a 0.4 A per evitar el sobreescalfament de les mostres.
- Confirmar la correcta transferència de les mostres tenyint la membrana amb Ponceau S (Veure condicions de preparació, Capítol IV) durant 5 min i destenyint amb aigua destil·lada. Tal i com s'ha comentat a l'inici d'aquest apartat, en el cas dels *pull down*, la tinció amb Ponceau S va permetre determinar els nivells d'expressió de les diferents proteïnes de fusió a GST.
- Bloquejar la membrana per evitar les unions inespecífiques a temperatura ambient, durant 1 h o a 4°C durant tota la nit, amb una solució bloquejant (Veure condicions de preparació, Capítol IV).

- Incubar la membrana amb l'anticòs primari preparat en PBS 1X amb 5% de llet sense greix i el 0.05% de Tween-20 a la temperatura i durant el temps adient, tal i com es detalla a la Taula 8.
- Rentar la membrana tres cops durant 5 min cadascun amb PBS 1X amb el 0.05 % de Tween-20.
- Incubar amb l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave preparat també en PBS 1X amb 5% de llet sense greix i el 0.05% de Tween-20.
- Rentar la membrana tres cops durant 5 min cadascun amb PBS 1X amb el 0.05 % de Tween-20.
- La detecció de les proteïnes d'interès es va realitzar per quimioluminiscència emprant el reactiu comercial *ECL plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences), seguint les instruccions de la casa comercial. Les membranes es van exposar en un film Curiex RPN 18X24 (Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Bèlgica) durant un temps variable o bé les imatges es van capturar amb l'aparell *VersaDoc 5000 Imager* (Bio-Rad) i processar amb el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

**Taula 8.** Resum dels anticossos primaris i secundaris emprats en les diferents immunodeteccions realitzades durant aquesta Tesi (co-IP, *pull down* i assaigs de luciferasa).

| Primaris        | Tipus                | Origen | Dilució | Temperatura | Temps incubació |
|-----------------|----------------------|--------|---------|-------------|-----------------|
| Anti-HA.11      | Monoclonal           | Ratolí | 1:2.000 | 25°C        | 1 h             |
| Anti-CnA        | Monoclonal           | Ratolí | 1:500   | 4°C         | Tota la nit     |
| Anti-GFP        | Monoclonal           | Ratolí | 1:2.000 | 25°C        | 1 h             |
| Anti-tubulina   | Monoclonal           | Ratolí | 1:5.000 | 25°C        | 1 h             |
| Anti-RCAN1      | Policlonal           | Conill | 1:2.000 | 4°C         | Tota la nit     |
| Anti-RCAN3      | Policlonal           | Ratolí | 1:2.000 | 25°C/4°C    | 2 h/Tota la nit |
| Secundaris      | Tipus <sup>(*)</sup> | Origen | Dilució | Temperatura | Temps incubació |
| Anti-IgG ratolí | Conjugat HRP         | Conill | 1:2.000 | 25°C        | 45 min          |
| Anti-IgG conill | Conjugat HRP         | Ratolí | 1:2.000 | 25°C        | 45 min          |

<sup>(\*)</sup> Els anticossos secundaris utilitzats tenen conjugada la peroxidasa de rave (*horseradish peroxidase*, HRP) i ambdós són de la casa comercial Dako, Glostrup, Dinamarca.

## 17. ASSAIGS DEL NIVELL DE TRANSLOCACIÓ DELS NFAT

Aquests assaigs es van realitzar per determinar la capacitat d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT tant de les proteïnes RCAN1-1 i RCAN3-2, senceres o fragments d'aquestes, com del producte IDI3A, (identificat a partir del cribratge d'una quimioteca, Veure Capítol III) en cèl·lules estimulades amb ionomicina. En general el protocol emprat va ser el mateix però a continuació es detallen les particularitats de cada assaig.

### 17.1. Determinació de la capacitat inhibidora de RCAN1-1 i RCAN3-2 de la translocació nuclear dels NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina

Aquests assaigs es van realitzar en cèl·lules COS-7 i van permetre caracteritzar la regió mínima de RCAN1-1 i RCAN3-2 responsable de la inhibició de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT *in vivo*.

❖ El protocol es detalla a continuació:

- Sembrar 150.000 cèl·lules COS-7 per pou sobre cobreobjectes col·locats dins de les plaques de cultiu de P6.
- L'endemà, co-transfectar 0.8 µg de cada construcció de *pEGFP-RCAN1-1* en estudi juntament amb 1.2 µg de *pHA-NFAT1-EYFP* o bé 1 µg de les construccions de *pEGFP-RCAN3-1,2,3,4,5* juntament amb 1 µg de *pHA-NFAT1-EYFP*.
- Deixar expressar les proteïnes de fusió a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant tota la nit.
- L'endemà, canviar el medi i realitzar tres tractaments:
  - Sense estimulació: afegir a les cèl·lules els vehicles corresponents a cadascun dels tractaments realitzats.
  - Estimulació: afegir 1 µM ionomicina durant 10 min.
  - Inhibició: afegir 1 µM CsA durant 30 min abans d'afegir la ionomicina.
- Rentar 2 cops amb PBS 1X i fixar amb paraformaldehid al 3% a 4°C durant 20-30 min.
- Rentar tres cops amb PBS 1X i muntar les preparacions emprant *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) segellant els cobreobjectes amb esmalt d'ungles transparent.
- Les proteïnes de fusió expressades amb EGFP i EYFP van ser visualitzades a 488 nm i 514 nm, respectivament, emprant un microscopi confocal Ar/HeNe (Leica DMIRBE, Heidelberg, Germany).

### 17.2. Determinació de la capacitat inhibidora del producte ID13A de la translocació nuclear dels NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina

❖ El protocol realitzat en cèl·lules U-2 OS es detalla a continuació:

- Sembrar 12.000 cèl·lules U-2 OS per pou sobre cobreobjectes col·locats dins de plaques de cultiu P24.
- L'endemà, transfectar 1.1 µg de *pHA-NFAT1-EYFP* i deixar expressar la proteïna de fusió a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> tota la nit.
- L'endemà, canviar el medi i deixar expressar la proteïna de fusió 24 h més a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

- L'endemà, afegir DMSO o el producte IDI3A a concentracions creixents (de 0.1 a 50  $\mu\text{M}$ ) i incubar a 37°C i 5%  $\text{CO}_2$  durant tota la nit.
- L'endemà, estimular les cèl·lules amb 2  $\mu\text{M}$  ionomicina i 10 mM  $\text{CaCl}_2$  durant 25 min.
- Continuar el protocol de fixació tal i com es descriu a l'apartat 17.1.

El producte IDI3A, que és fluorescent, i la proteïna de fusió a EYFP van ser visualitzats a 458 nm i 514 nm, respectivament, emprant un microscopi confocal Ar/HeNe (Leica DMIRBE, Heidelberg, Germany).

La visualització i captura d'imatges de microscopia confocal es van realitzar a la Unitat de Microscopia Confocal i Micromanipulació Cel·lular del Servei Científic Tècnic de la Universitat de Barcelona.

## 18. ANÀLISI DE PROMOTORS AMB EL GEN MARCADOR DE LA LUCIFERASA

Aquests assaigs es van realitzar en cèl·lules HEK 293T per determinar l'especificitat de l'efecte inhibidor de RCAN3-2. Per això es van emprar plasmidis que contenen el gen marcador de la luciferasa sota el control d'un promotor que contenia 3 llocs d'unió dels factors de transcripció NFAT (3xNFAT-luc) o sota el control d'un promotor que tenia 6 llocs d'unió del factor de transcripció  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (6x $\text{NF}\kappa\text{B}$ -luc).

❖ El protocol general va ser el següent:

- Sembrar 60.000 cèl·lules per pou en plaques P12 i deixar a 37°C i 5%  $\text{CO}_2$  tota la nit.
- L'endemà, transfectar 0.5  $\mu\text{g}$  dels plasmidis 3xNFAT-luc o 6x $\text{NF}\kappa\text{B}$ , respectivament, en presència de *pHA* (150 ng) o quantitats creixents de *pHA-RCAN3-1,2,3,4,5* (15 i 150 ng) i de 0.5  $\mu\text{g}$  de *pCMV- $\beta$ gal*, que va ser emprat com a control intern de l'eficiència de transfecció. A més, en els pous amb els quals es va analitzar el promotor amb caixes de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  també es va incloure 100 ng de *pEGFP* o *pEGFP-p65*, ja que la proteïna p65 va ser la responsable de l'activació d'aquest promotor.
- Incubar a 37°C i 5%  $\text{CO}_2$  durant tota la nit.
- L'endemà, canviar el medi i realitzar tres tractaments a les cèl·lules transfectades amb el gen de la luciferasa sota el control del promotor amb caixes NFAT:
  - Sense estimulació: afegir a les cèl·lules els vehicles corresponents a cadascun dels tractaments realitzats.
  - Estimulació: afegir 1  $\mu\text{M}$  ionomicina, 20 nM PMA i 10 mM  $\text{CaCl}_2$  durant 8 h.
  - Inhibició: afegir 1  $\mu\text{M}$  CsA durant 2 h abans d'afegir la ionomicina+PMA+ $\text{CaCl}_2$ .
- Rentar les cèl·lules de tots els pous amb PBS 1X atemperat suplementat amb 0.1 mg/ml  $\text{CaCl}_2$  i 0.1 mg/ml  $\text{MgCl}_2$  per evitar que les cèl·lules es desenganxin de la placa.

- Afegir 100 µl de *Reporter Lysis Buffer 1X* (Promega) per cada pou i posar la placa a agitar a temperatura ambient durant 5 min. Congelar la placa a -80°C un mínim de 5 min.
- Atemptar la placa i recollir les cèl·lules amb un rascador. Centrifugar-les a temperatura ambient, 5 min a velocitat màxima. Recollir el sobrenedant.
- L'activitat luciferasa es va mesurar amb 10 µl del sobrenedant directe o diluït, emprant el sistema comercial *Luciferase Assay System* (Promega), seguint les instruccions de la casa comercial en el luminòmetre TD-20/20 (Turner biosystems, CA, USA).
- L'activitat β-galactosidasa es va mesurar barrejant 20 µl de sobrenedant amb 100 µl de substrat de la β-galactosidasa (Veure condicions de preparació, Capítol IV) i incubant a 37°C fins a desenvolupar el color groc indicatiu de la reacció. A continuació, es va aturar la reacció afegint 100 µl de 1 M CaCO<sub>3</sub>. La quantificació de la reacció colorimètrica es va fer llegint l'absorbància a 405 nm en un espectrofotòmetre o lector de plaques d'ELISA, considerant-se només els valors compresos entre 0.1 i 0.8 que corresponen als marges de linealitat de l'assaig.
- Les unitats de luciferasa obtingudes de cadascuna de les mostres i dels controls es van normalitzar dividint aquestes respecte de la corresponent lectura de la β-galactosidasa obtinguda. A aquest valor se'l va considerar en tots les casos com les unitats de luciferasa relatives. L'activació o inhibició dels promotor amb caixes NFAT o NFκB de les mostres es va calcular dividint les unitats de luciferasa relatives de cada mostra respecte de les unitats de luciferasa relatives de la mostra control no estimulada que únicament havia estat transfectada amb *pHA*, en el cas del promotor de NFAT i amb *pHA* i *pEGFP*, en el cas de NFκB.

Aquests experiments es van realitzar 3 cops de manera independent i per triplicat.

Es va fer un pou més de cada mostra per analitzar les proteïnes EGFP, EGFP-p65 i HA-RCAN3-2 sobreexpresades mitjançant transferència de *Western*. Els extractes proteics solubles es van obtenir afegint 100 µl del tampó de lisi emprat per fer els extractes solubles de la co-IP de RCAN1-1-CnA a cada pou. Els anticossos primaris que es van fer servir van ser: anti-HA.11, anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) i anti-αtubulina (Sigma-aldrich), tots tres de ratolí. Les condicions específiques d'incubació per a cada anticòs es troben detallades a la Taula 8.

## 19. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'EXPRESSIONI DE DIVERSOS GENS PER PCR A TEMPS REAL

Per tal d'analitzar l'efecte inhibidor de les proteïnes RCAN1-1 i RCAN3-2 senceres o fragments d'aquestes sobre l'activació de cèl·lules Jurkat es van determinar els nivells d'expressió de diversos gens, entre ells algunes citoquines dependents de NFAT, per PCR a temps real utilitzant *arrays* de baixa densitat (*Micro Fluidic Cards*, Applied Biosystems).

L'aparell emprat va ser l'ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System i cada targeta estava formada per 384 pous que van permetre analitzar 48 gens simultàniament.

❖ El protocol que es va seguir va ser el següent:

- Transfectar cèl·lules Jurkat amb les diferents proteïnes de fusió a EGFP de RCAN1-1 i RCAN3-2 i deixar expressar les proteïnes durant 5 h a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
- Rentar 2 cops les Jurkat amb PBS 1X, filtrar-les amb un filtre de nylon per disgregar els grumolls i seleccionar 500.000 cèl·lules verdes per cada punt mitjançant un citòmetre de flux (BD FACSAria Flow Cytometer, Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA).

Aquest treball va ser realitzat al Servei de Citometria de la Fundació per a la Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón de Barcelona.

- Centrifugar a 300 g durant 10 min i resuspendre amb RPMI complet.
- Estimular o inhibir les cèl·lules Jurkat tal com s'ha descrit prèviament a l'apartat 12.1 durant 3 h i 30 min.
- Extreure el RNA i fer la retrotranscripció de 200 ng del RNA total, tal com s'ha descrit a l'apartat 12.3.
- Per cada mostra preparar una barreja de reacció de 200 µl que contenia el cDNA de les cèl·lules Jurkat provinent de 200 ng del RNA total i la barreja comercial *TaqMan® Universal PCR Master Mix 1X*.
- Amb cada mostra carregar cadascun dels dos ports de la targeta que van permetre analitzar els 48 gens.
- Centrifugar la placa 2 cops a 250 g durant 1 min cada vegada, segellar-la per evitar que les mostres s'evaporin i processar-la.
- Les condicions de la PCR a temps real recomanades per Applied Biosystems van ser:
  - 50 °C 2 min
  - 94.5 °C 10 min
  - 97 °C 30 s
  - 59.7 °C 1 min } 40 cicles
- Els resultats obtinguts es van analitzar amb el programa *Sequence Detection System software version 2.1* (SDS 2.1., Applied Biosystems).

Les PCR van mostrar una eficiència aproximada de 2, la qual cosa va permetre quantificar de manera relativa l'expressió gènica mitjançant el mètode comparatiu del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Tots els valors obtinguts, de les mostres i dels controls, van ser normalitzats respecte el *GAPDH* i el *18S* ribosòmic, obtenint-se valors equivalents. La mostra



transfectada amb pEGFP i estimulada amb ionomicina+PMA va ser considerada com la mostra calibradora de l'assaig, i la seva expressió gènica va ser considerada en tots els casos com el 100%. Els valors relatius de cada mostra es van obtenir referint els valors normalitzats de cada mostra respecte del valor normalitzat de la mostra calibradora. L'increment màxim de la desviació estàndard permès entre els duplicats va ser sempre menor de 0.38 i la línia base va ser establerta manualment en tots els casos. Tots els experiments es van dur a terme un mínim de dues vegades per duplicat.

**Taula 9.** Taula resum que conté les referències de les sondes Taqman d'Applied Biosystems emprades per detectar els diferent gens analitzats en aquesta treball.

|               | Sondes        |
|---------------|---------------|
| GAPDH         | Hs99999905_m1 |
| 18S ribosòmic | 4342379       |
| CSF2          | Hs00171266_m1 |
| IFN           | Hs00174143_m1 |
| TNF           | Hs00174128_m1 |
| IL2           | Hs00174114_m1 |
| IL3           | Hs00174117_m1 |
| IL13          | Hs00174379_m1 |
| RCAN1         | Hs00231766_m1 |
| RCAN3         | Hs00203728_m1 |
| LTA           | Hs00236874_m1 |
| LTB           | Hs00242739_m1 |

Les targetes Micro Fluídiques van ser cedides amablement pel Dr. Josep Maria Grinyó, Dr. Daniel Seron, Dr. Miquel Hueso (Servei de nefrologia, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona) i el Dr. Estanis Navarro (COM-IDIBELL, Barcelona).

El processament de les targetes Micro Fluídiques es va realitzar a la Unitat de Genòmica del Servei Científic Tècnic de la Universitat de Barcelona.

## 20. PRODUCCIÓ D'UN ANTICÓS POLICLONAL ANTI-RCAN3-2 EN ASCITES DE RATOLÍ

Per poder caracteritzar la proteïna RCAN3-2 únicament predita des d'un punt de vista bioinformàtic fins al moment de realitzar aquesta treball experimental, es va abordar la producció d'un anticòs que reconegués a RCAN3-2.

- ❖ El protocol que es va seguir per generar aquest anticòs va ser el següent:

- La producció d'anticossos es va realitzar utilitzant 4 ratolins Balb/c femelles.
- Preparar una emulsió barrejant adjuvant de Freund complet (Sigma-Aldrich) amb la proteïna RCAN3-2(2-144) en una proporció de 9:1. El volum total a injectar va ser de 200 µl per cada animal i va contenir de 50-200 µg de proteïna cada vegada.
- Remenar l'emulsió enèrgicament durant 1 min i immediatament injectar intraperitonealment 100 µl de la barreja a cada costat de l'animal.
- Passats uns dies, tornar a inocular proteïna RCAN3-2(2-144) però en forma d'emulsió amb adjuvant de Freund incomplet (Sigma-Aldrich).
- Repetir les inoculacions cada setmana fins que els ratolins incrementin de manera significativa el seu pes preparant les emulsions sempre amb adjuvant de Freund incomplet.
- Extreure el líquid ascític per punció intraperitoneal, centrifugar per eliminar impureses de l'extracció i recollir el sèrum present en els sobrenedants. Congelar a -80°C.

Les inoculacions van ser realitzades directament per la Dra. Mercè Pérez-Riba i la doctoranda hi va col·laborar.

El tractament i sacrifici dels animals es va realitzar seguint les recomanacions i protocols pel tractament adequat dels animals de laboratori aprovats pel CEEA-IRO (Comité Ético de Experimentación Animal) i sota la supervisió del personal del Servei de l'Estabulari de l'IDIBELL.

## CAPITOL III: ASSAIGS *IN VITRO* AMB PÈPTIDS I QUIMIOTEQUES COMBINATÒRIES

### ▪ MATERIALS

#### 21. PÈPTIDS I QUIMIOTEQUES COMBINATÒRIES

❖ La caracterització de les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN i Cn va requerir la síntesi de diversos pèptids que estan recollits a la Taula 10.

**Taula 10.** Taula resum que inclou tots els pèptids emprats en la caracterització *in vitro* de les interaccions dels C18 de les RCAN amb Cn.

| Pèptid (*)   | Seqüència                                  |
|--------------|--|
| C18-RCAN1    | Ac-KYELHAATDTPSVVVHVCEs-NH <sub>2</sub>    |
| CF-C18-RCAN1 | CF-GG-KYELHAATDTPSVVVHVCEs-NH <sub>2</sub> |
| C18-RCAN3    | Ac-KYELHAGTESTPSVVHVCEs-NH <sub>2</sub>    |
| CF-C18-RCAN3 | CF-GG-KYELHAGTESTPSVVHVCEs-NH <sub>2</sub> |
| C18-random   | Ac-SAVTHKLESVDPATVYCETHV- NH <sub>2</sub>  |
| P74          | Ac-RGKWTYNGYIEGR-NH <sub>2</sub>           |
| VIVIT        | Ac-MAGPHPVIVITGPHEE-NH <sub>2</sub>        |
| CF-VIVIT     | CF-GG-MAGPHPVIVITGPHEE-NH <sub>2</sub>     |
| SPRIEIT      | Ac-ASGLSPRIEITPSHEL-NH <sub>2</sub>        |
| CF-SPRIEIT   | CF-GG-ASGLSPRIEITPSHEL-NH <sub>2</sub>     |
| PKIIQT       | Ac-PKPKIIQTRRPEY-NH <sub>2</sub>           |
| CF-PKIIQT    | CF-GG-PKPKIIQTRRPEY-NH <sub>2</sub>        |
| LxVP         | Ac-DQYLAVPQHPYQWAK-NH <sub>2</sub>         |
| LxVPmut      | Ac-DQYAAAAQHPYQWAK-NH <sub>2</sub>         |
| RII          | Ac-DLDVPIPGRFDRRVSAAE-NH <sub>2</sub>      |

(\*) CF, significa carboxifluoresceïna. Els pèptids marcats amb CF al seu extrem N-terminal contenen dues glicines espaciadores (GG) entre el fluorocrom i el pèptid. El pèptid C18-random correspon a la seqüència del pèptid C18-RCAN1 ordenada a l'atzar. Si no s'indica el contrari, els pèptids es van resuspendre en el 10% de DMSO en aigua.

❖ El cribratge d'una quimioteca combinatòria de mescles d'hexapèptids de D-aminoàcids vers la interacció C18-RCAN1-Cn va permetre deconvolucionar les dades obtingudes i sintetitzar 16 hexapèptids definits formats per D-aminoàcids que estan recollits a la Taula 11.

**Taula 11.** Hexapèptids de D-aminoàcids de seqüència definida.

|   |                           |   |                           |    |                           |    |                           |
|---|---------------------------|---|---------------------------|----|---------------------------|----|---------------------------|
| 1 | Ac-tatckG-NH <sub>2</sub> | 5 | Ac-tatpkG-NH <sub>2</sub> | 9  | Ac-thtckG-NH <sub>2</sub> | 13 | Ac-thtpkG-NH <sub>2</sub> |
| 2 | Ac-tatckv-NH <sub>2</sub> | 6 | Ac-tatpkv-NH <sub>2</sub> | 10 | Ac-thtckv-NH <sub>2</sub> | 14 | Ac-thtpkv-NH <sub>2</sub> |
| 3 | Ac-tatcqG-NH <sub>2</sub> | 7 | Ac-tatpqG-NH <sub>2</sub> | 11 | Ac-thtcqG-NH <sub>2</sub> | 15 | Ac-thtpqG-NH <sub>2</sub> |
| 4 | Ac-tatcqV-NH <sub>2</sub> | 8 | Ac-tatpqv-NH <sub>2</sub> | 12 | Ac-thtcqv-NH <sub>2</sub> | 16 | Ac-thtpqv-NH <sub>2</sub> |

Tots els pèptids utilitzats en aquest treball experimental van ser sintetitzats i purificats al Laboratorio de Péptidos y Proteínas del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, València) pel Dr. Joaquim Messeguer (Unitat de Química Bioorgànica de l'Institut d'investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona) i per l'Ana Giménez i la Laura Cascales (CIPF).

❖ Les quimiotèques combinatòries de mescles o de composts sols que s'han analitzat durant la realització d'aquesta treball experimental estan recollides a la Taula 12.

**Taula 12.** Taula resum de les diferents quimiotèques combinatòries utilitzades detallant la mida, composició i el número de molècules que contenen.

| Tipus                      | Mida          | Composició               | Molècules           |
|----------------------------|---------------|--------------------------|---------------------|
| Peptoides                  | 500 Da        | N-alquilglicines         | 5.120               |
| Peptoides                  | 850 Da        | N-alquilglicines         | 625                 |
| Pèptids                    | 6 residus     | D-aminoàcids             | 2.5x10 <sup>6</sup> |
| Estructures hèlix $\alpha$ | 17 residus    | L-aminoàcids             | 16x10 <sup>4</sup>  |
| Estructures full $\beta$   | 10 residus    | L-aminoàcids             | 16x10 <sup>4</sup>  |
| Composts sols              | 450 Da        | Sals de tetraalquilamoni | 11                  |
| Composts sols              | De 100-900 Da | Diversa                  | 237                 |

Totes les quimiotèques van ser proporcionades pel grup del Dr. Enrique Pérez Payá (Laboratorio de Péptidos y Proteínas, CIPF, Valencia) i pel grup del Dr. Àngel Messeguer (Unitat de Química Bioorgànica, IIQAB, CSIC, Barcelona) amb qui s'ha col·laborat en la realització del projecte "*Caracterización funcional de la interacción calcipressina 1-*

*calcineurina y aplicación al desarrollo de nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn*”, finançat per la Fundació La Marató de TV3, referència 030830.

❖ El producte IDI3A va ser identificat a partir del cribratge inicial de la quimioteca de composts definits formada per 237 molècules. Aquesta quimioteca estava constituïda per molècules diverses disponibles tant al Laboratorio de Péptidos y Proteínas del CIPF (València) com a la Unitat de Química Bioorgànica, IIQAB del CSIC (Barcelona). Per la realització dels assaigs funcionals, el producte IDI3A va haver de ser sintetitzat al laboratori. Aquest treball va ser realitzat per la Dra. Carina Delpiccolo de la Unitat de Química Bioorgànica, IIQAB del CSIC (Barcelona).

## ▪ MÈTODES

### 22. ANÀLISI DELS PÈPTIDS PER DICROÏSME CIRCULAR

El dicroïsme circular és una tècnica que permet determinar l'estructura conformacional que adopten els pèptids o proteïnes en solució.

- ❖ El protocol general seguit per determinar el plegament dels pèptids va ser:
  - Resuspendre els pèptids liofilitzats en 20 mM tampó fosfat pH 7.0 i analitzar-los a una concentració final de 50  $\mu$ M emprant cubetes de quars de 0.1 cm de pas de llum en un espectropolarímetre Jasco-810 (JASCO corporation, Tokio, Japó).
  - Els espectres obtinguts corresponen a la mitja de 20 captures realitzades en intervals de 1 mm des de la longitud d'ona 195 a 250 nm. En tots els casos, a l'espectre obtingut dels pèptids se'l va restar l'espectre del tampó sol, que va ser considerat com el soroll de fons de l'assaig.
  - Les mesures de la conformació dels pèptids a diferents temperatures, 5°C o 20°C, es van poder realitzar donat que el dicrògraf emprat està equipat amb un controlador de temperatura Peltier.
  - Les induccions de plegament es van fer en presència del 50% de Metanol o de trifluoroetanol (TFE), respectivament.
  - Els resultats estan expresats com la mitjana molar de les el·lipticitats dels residus ( $[\theta]_{MR}$  (degcm<sup>2</sup>/dmol)).

### 23. ASSAIGS D'ANISOTROPIA DE FLUORESCÈNCIA

La caracterització de les interaccions pèptids-CnA $\alpha$  així com els cribratges de molècules disruptores de les interaccions C18-RCAN1-Cn i VIVIT-Cn han estat analitzats

mitjançant anisotropia de fluorescència (Veure la descripció del principi de la tècnica a la Introducció).

### 23.1. Posada a punt de les interaccions pèptids-CnA $\alpha$ i determinació per anisotropia de fluorescència

❖ El protocol general dels assaigs realitzats va ser el següent:

- Resuspendre els pèptids liofilitzats de tal manera que les solucions mare estiguin tant concentrades com sigui possible, en especial, les corresponents als pèptids no marcats. Preservar de la llum els pèptids marcats.
- Aliquotar els pèptids en els volums que s'utilitzaran de treball i congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Així s'evita que les successives congelacions i descongelacions els malmetin.
- Sonicar els pèptids i les quimioteques durant 15 min abans de ser emprats per evitar que s'agreguin.
- Quantificar per espectrofotometria la CnA $\alpha$ , aliquotar-la en els volums adients i congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per tal de preservar al màxim la seva integritat.
- Per establir les corbes de saturació *in vitro* es va concentrar la CnA $\alpha$  utilitzant els concentradors Microcon<sup>®</sup> YM-10 1 (Limit de Pes Molecular Nominal 10.000. Millipore, Billerica, MA, USA), seguint les instruccions del fabricant, i es van realitzar els assaigs al moment.
- Tots els assaigs van ser realitzats en plaques negres OptiPlate-96F(PB) (Perkin Elmer) i sempre que va ser possible per triplicat.
- Habitualment, es van preparar barreges que incloïen els components comuns a tots els pous per tal d'assegurar les mateixes condicions en les diferents mostres i controls de l'assaig.
- Cada assaig va incloure quatre controls analitzats per triplicat o quadruplicat en tots els casos. Aquests controls van ser:
  - Control blanc: Aquests pous contenien tots els components de la barreja emprada a l'assaig excepte els pèptids i la CnA $\alpha$ .
  - Control lliure: Aquest pou contenien tot els components de la barreja i el pèptid marcat, però no la CnA $\alpha$  ni el pèptid no marcat.
  - Control unit: Aquests pous incloïen tots els components de la barreja, la CnA $\alpha$  i el pèptid marcat, però no el pèptid no marcat.
  - Control inhibidor: Aquests pous incloïen tots els components de la barreja, la CnA $\alpha$  i els pèptids, tant el marcat com el no marcat.
- Les reaccions es van dur a terme sempre en 200  $\mu\text{l}$  de volum final i els components de la barreja de reacció es van anar afegint seguint un ordre establert:
  - Primer: afegir l'aigua, el PBS1X i el volum necessari dels diferents diluents en els que estan resuspendos alguns dels components de la barreja, per tal d'igualar les

condicions de l'assaig en tots els pous. Cal recordar que la majoria de pèptids van ser resuspesos en el 10% de DMSO en aigua i que el FK506 estava dissolt en etanol.

- Segon: suplementar amb el DTT necessari el tampó de la proteasa PreScission en el qual està dissolta la CnA $\alpha$  (Veure condicions de preparació, Capítol IV), just abans del seu ús i afegir-lo immediatament a la barreja de reacció. Seguidament, afegir un 1% d'albúmina sèrica bovina fracció V (BSA) a la barreja.

- Tercer: afegir la CnA $\alpha$  acabada de descongelar en tots els pous excepte en els del control blanc i el control lliure.

- Quart: afegir el pèptid marcat en tots els pous, excepte en els del control blanc.

- Incubar durant 15 min exactes a temperatura ambient i realitzar la lectura de la placa immediatament.
- En els assaigs de competició de les diferents interaccions, tant els pèptids no marcats com les molècules de les quimioteques combinatòries, van ser afegits en els pous corresponents després de la CnA $\alpha$  i es van incubar durant 15 min exactes a temperatura ambient. A continuació, es va afegir el pèptid marcat a tots els pous, excepte els del control blanc, i es va incubar 15 min més exactes a temperatura ambient. Finalment, es va realitzar la lectura de la placa.
- En general, la preparació, processament i lectura d'una placa de 96 pous completa va durar dues hores.
- En tots els casos, la detecció de la fluorescència polaritzada es va fer emprant el lector de plaques *Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel HTS Counter* (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) i les dades es van processar amb el software *Wallac 1420 Manager* (Perkin Elmer).

❖ L'establiment de les corbes de saturació es va realitzar fixant la concentració del pèptid marcat en 30 nM i incubant-lo en presència de concentracions creixents de CnA $\alpha$  fins arribar a saturar la interacció.

❖ Els assaigs de competició es van realitzar establint les interaccions entre el pèptid marcat a 30 nM i la CnA $\alpha$  a una concentració una mica més alta que la definida per la corresponent  $K_d$  (Veure la definició del paràmetre, Capítol III, Apartat 23.2) del pèptid marcat. Aquesta interacció es va posar en presència de concentracions creixents de pèptid no marcat fins arribar a desplaçar la interacció completament. En el cas dels assaigs de competició, primer es van posar en contacte la CnA $\alpha$  amb les concentracions creixents del pèptid no marcat i posteriorment es va afegir la concentració fixada del pèptid marcat.

❖ Les condicions de detecció del lector de plaques emprat estan resumides a la Taula 13.

**Taula 13.** Condicions del lector de plaques *Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel HTS Counter* utilitzat.

| Filtre excitació | Filtre emissió | Temps de comptatge | Factor G | Energia làmpara-CW |
|------------------|----------------|--------------------|----------|--------------------|
| FP480 nm         | FP535 nm       | 0,1 s              | 1,2      | 65535              |

Es detallen els filtres emprats, la durada de la mesura, el factor G propi de l'aparell i l'energia de la làmpara utilitzada.

❖ Les condicions optimitzades per les diferents interaccions analitzades es resumeixen a la Taula 14.

**Taula 14.** Paràmetres optimitzats per l'establiment de les corbes de saturació realitzades i càlcul de les corresponents  $K_d$  i  $IC_{50}$ .

| Interaccions  | Components   | Concentracions | Interaccions  | $K_d$ [ $\mu M$ ] | $IC_{50}$ [ $\mu M$ ] |
|---------------|--------------|----------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| C18-RCAN1-CnA | CF-C18-RCAN1 | 30 nM          | C18-RCAN1-CnA | 1.25              | 3.7                   |
|               | CnA          | 1.5 $\mu M$    | C18-RCAN3-CnA | 0.85              | 5.9                   |
| C18-RCAN3-CnA | CF-C18-RCAN3 | 30 nM          | SPRIEIT-CnA   | 6.25              | 13                    |
|               | CnA          | 1.5 $\mu M$    | VIVIT-CnA     | 0.63              | 0.94                  |
| SPRIEIT-CnA   | CF-SPRIEIT   | 30 nM          |               |                   |                       |
|               | CnA          | 10 $\mu M$     |               |                   |                       |
| VIVIT-CnA     | CF-VIVIT     | 30 nM          |               |                   |                       |
|               | CnA          | 0.5 $\mu M$    |               |                   |                       |

$K_d$  significa constant de dissociació i  $IC_{50}$  significa concentració d'inhibició del 50%. Aquests dos paràmetres es troben definits en detall a l'apartat 23.2.

### 23.2. Anàlisi de les dades obtingudes: càlculs de les $K_d$ i $IC_{50}$

• L'aparell *Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel HTS Counter* emprat desglosa la llum emesa polaritzada en dos paràmetres:

- S o  $I_{pa}$ : corresponent a la intensitat de llum emesa paral·lela.
- P o  $I_{pe}$ : corresponent a la intensitat de llum emesa perpendicular.



- L'equació emprada per l'anàlisi de les dades va ser la següent:

$$(mP) \text{ Polarització} = 10^3 x (I_{pa} - 1.2 \cdot I_{pe}) / (I_{pa} + 1.2 \cdot I_{pe})$$

Les dades obtingudes a partir del lector de plaques van ser processades amb el programa *GraphPad PRISM*® 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Aquest programa va permetre calcular les  $K_d$  i  $IC_{50}$  per a cadascuna de les interaccions analitzades:

- La  $K_d$  dels pèptids marcats utilitzats correspon a la concentració de  $CnA\alpha$  a la qual el 50% del pèptid marcat es troba lliure i l'altre 50% interaccionant amb  $CnA\alpha$ . Cal recordar també que la constant d'afinitat ( $K_a$ ) dels pèptids marcats correspon a la inversa de la seva  $K_d$ .

Les  $K_d$  van ser calculades aplicant un model de dosi-resposta sigmoidal i l'equació aplicada pel programa *GraphPad PRISM*® 4.0 va ser la següent:

$$Y = \text{Mínim} + \frac{(\text{Màxim} - \text{Mínim})}{1 + 10^{\text{Log EC50} - X}}$$

Aquesta és una equació general emprada per curves que mostren un comportament dosi-resposta. La X correspon al logaritme de la concentració de  $CnA\alpha$  mentre que la Y correspon a la interacció amb els pèptids marcats. Aquesta equació també se l'anomena equació logística de tres paràmetres. Els paràmetres "Mínim" i "Màxim" corresponen als valors de polarització menors i majors, respectivament, obtinguts a l'assaig. El paràmetre "LogEC50" correspon al logaritme de la EC50, que és la concentració efectiva al 50%, i en el nostre cas equival a la  $K_d$  dels pèptids analitzats.

- La  $IC_{50}$  dels pèptids no marcats analitzats correspon a la concentració de  $CnA\alpha$  a la qual el pèptid no marcat competeix en un 50% la interacció entre el pèptid marcat i  $CnA\alpha$ .

Les  $IC_{50}$  van ser calculades aplicant un model anomenat "*One site competition*" i l'equació aplicada pel programa *GraphPad PRISM*® 4.0 va ser la següent:

$$Y = \text{Mínim} + \frac{(\text{Màxim} - \text{Mínim})}{1 + 10^{X - \text{Log EC50}}}$$

Aquesta equació descriu la competició entre dos pèptids respecte un únic lloc d'interacció amb un lligand. En aquest cas la variable "LogEC50" correspon a la concentració de  $CnA\alpha$  a la qual el pèptid competidor desplaça un 50% la interacció analitzada i en el nostre cas equival a la  $IC_{50}$  dels pèptids analitzats.

## 24. ENTRECREUAMENT DE PÈPTIDS AMB FORMALDEHID

Per tal de determinar de manera qualitativa la interacció entre proteïnes es poden realitzar assaigs d'entrecreuament emprant diversos productes com ara el glutaraldehyd o el formaldehyd. El formaldehyd estableix unions covalents entre les amines primàries de proteïnes que es trobin properes. Aquest tipus d'assaigs s'han realitzat per confirmar les interaccions entre diversos pèptids i CnA $\alpha$  així com entre els complexos fàrmac-immunofilina (CsA-CyPA i FK506-FKBP12) i CnA $\alpha$ .

❖ El protocol general que es va seguir va ser el següent:

- Per cada interacció a analitzar es van preparar dos tubs:
  - Un tub amb només la CnA $\alpha$  a 2.5  $\mu$ M.
  - Un tub amb la CnA $\alpha$  a 2.5  $\mu$ M en presència d'un excés de 10 cops més de cadascun dels pèptids analitzats (25  $\mu$ M) o dels complexos fàrmac-immunofilina. Pel que fa als complexos fàrmac-immunofilina, com que l'estequiometria de dites interaccions és 1:1 es va afegir una concentració de 25  $\mu$ M de CsA, CyPA, FK506 i FKBP12.
- El volum final de totes les reaccions va ser de 100  $\mu$ l en PBS 1X.
- Incubar a 25°C durant 15 min agitant a 250 rpm per permetre que les interaccions s'estableixin.
- Afegir 0.37% de formaldehyd.
- Incubar a 25°C durant 10 min agitant a 250 rpm.
- Aturar la reacció afegint 125 mM de glicina.
- Analitzar les mostres immediatament o congelar a -80°C fins al seu processament.

Les interaccions van ser analitzades per MALDI-TOF amb un espectròmetre de masses 4700 *Proteomics Analyzer (PA)* (Applied Biosystems) al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe de València i les dades van ser analitzades amb el programa *Data Explorer 4.5* (Applied Biosystems).

## 25. ASSAIGS DE FOSFORILACIÓ DE PÈPTIDS *IN VITRO* AMB LA PROTEÏNA QUINASA A DEPENDENT D'AMP<sub>c</sub> (PKA)

Amb l'objectiu de determinar la susceptibilitat dels pèptids C18 de les RCAN en ser fosforilats es van realitzar assaigs de fosforilació *in vitro* emprant la PKA.

- ❖ El protocol emprat per la realització d'aquest assaig va ser el següent:
- Preparar una barreja de reacció que estava formada per:
    - 220  $\mu\text{M}$  pèptids C18 de les RCAN no marcats
    - 2 mmol ATP
    - 8 mmol  $\text{MgCl}_2$
    - 80 U PKA (Sigma-Aldrich)
  - El volum final de totes les reaccions va ser de 300  $\mu\text{l}$  en 50 mM Tampó Tris-HCl pH 7.5.
  - Un cop barrejats tots els components, agafar immediatament 150  $\mu\text{l}$  i aturar la reacció amb 225  $\mu\text{l}$  d'àcid tricloroacètic al 30% (TCA). Guardar a 4°C durant tota la nit. Aquesta mostra va ser considerada com la mostra control no fosforilada.
  - Deixar agitant els altres 150  $\mu\text{l}$  restants de la barreja de reacció a 37°C a 250 rpm tota la nit. L'endemà aturar la reacció amb TCA tal i com s'ha descrit anteriorment. Aquesta va ser considerada la mostra fosforilada.
  - Centrifugar totes les mostres durant 10 min a velocitat màxima. Recollir el sobrenedant i processar-lo immediatament.

Aquestes mostres van ser analitzades per MALDI-TOF amb un espectròmetre de masses al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe de València.

## CAPITOL IV: REACTIUS D'ÚS GENERAL

### A. SOLUCIONS GENERALS EMPRADES EN LA MANIPULACIÓ DE BACTERIS

- ❖ Tampó de càrrega 6X de DNA:  
0.25% (p/v) blau de bromofenol, 0.25% (p/v) xylene cyanol FF i 30% (v/v) glicerol en aigua. Deixar agitant tot el dia fins a la completa dissolució.
- ❖ LB (medi Luria Bertani):  
1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracte de llevat i 1% (p/v) de NaCl. Ajustar a pH 7.0 amb NaOH.
- ❖ LB+agar:  
LB+1.5% (p/v) agar.
- ❖ Les concentracions de les solucions mares i de les solucions de treball dels diferents antibiòtics emprats es resumeixen en la Taula 15.

**Taula 15.** Antibiòtics emprats en la manipulació de bacteris.

| Antibiòtic    | [Solució mare] | Diluent | [Final]   |
|---------------|----------------|---------|-----------|
| Ampicilina    | 100 µg/ml      | Aigua   | 100 ng/ml |
| Cloramfenicol | 170 µg/ml      | Etanol  | 170 ng/ml |
| Kanamicina    | 50 µg/ml       | Aigua   | 50 ng/ml  |
| Tetraciclina  | 50 µg/ml       | Etanol  | 50 ng/ml  |

Es detallen les concentracions de les solucions mare, les concentracions finals d'ús i el diluent de cada antibiòtic.

- ❖ Solució de CaCl<sub>2</sub> per preparar cèl·lules competents per xoc tèrmic:  
10 mM PIPES [(piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid))], 60 mM CaCl<sub>2</sub> i 15% (v/v) glicerol. Filtrar. Emmagatzemar a 4°C.
- ❖ Solució mare de X-Gal:  
2% (p/v) de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-galactòsid en N, N'-dimetil formamida. Protegir de la llum.
- ❖ Sephadex G-50:  
Barrejar de 9-11 ml d'aigua milliQ per cada g de Sephadex G-50 i deixar reposar tota la nit a temperatura ambient. L'endemà, afegir aigua milliQ de manera que el líquid cobreixi com a mínim 1 cm per sobre de la resina. Emmagatzemar a 4°C.
- ❖ Tampó de lisi de bacteris per purificar les proteïnes de fusió GST, GST-RCAN3-2(2-144) i GST-RCAN3-2(178-203):  
1 mM ditiotreitòl (DTT), 0.5 mM PMSF, 0.1% (v/v) Tritó X-100 en PBS 1X.

- ❖ Tampó de la proteasa Factor Xa:  
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl i 1 mM CaCl<sub>2</sub>.
- ❖ Tampó de lisi de bacteris per purificar les diferents proteïnes de fusió GST-CnA $\alpha$ :  
5 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA (àcid etilen glicosil-bis(aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacètic), 2  $\mu$ g/ml aprotinina (Sigma-Aldrich), 2  $\mu$ g/ml leupeptina (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/ml DNasa I (Roche) i 1 mg/ml lisozima (Fluka, Sigma-Aldrich) en PBS 2X.
- ❖ Tampó de la proteasa PreScission:  
50 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM EDTA (àcid etilendiaminotetraacètic), 2  $\mu$ g/ml aprotinina i 2  $\mu$ g/ml leupeptina.
- ❖ Tampó Laemmli de càrrega 6X:  
70% (v/v) 4X Tris-HCl/SDS pH 6.8, 30% (v/v) glicerol, 10% (p/v) SDS, 9.3% (p/v) DTT 0.012% (p/v) blau de bromofenol. Abans d'utilitzar, suplementar amb el 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- ❖ Gel concentrador al 10% per SDS-PAGE:  
3.8% acrilamida, 0.1% bis-acrilamida, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.07% persulfat amònic (APS) i 0.025% N, N, N', N'-tetraetilendiamina (TEMED).
- ❖ Gel separador al 10% per SDS-PAGE:  
10% d'acrilamida, 0.27% bis-acrilamida, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.07% APS i 0.025% TEMED.
- ❖ Tampó d'electroforesi 5X de SDS-PAGE:  
124 mM Tris, 960 mM glicina i 17 mM SDS.
- ❖ Solució fixadora colorant de proteïnes Coomassie Blue:  
0.025% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% (v/v) metanol i 7% (v/v) d'àcid acètic.
- ❖ Solució decolorant I de Coomassie Blue:  
40% (v/v) metanol i 7% (v/v) d'àcid acètic.
- ❖ Solució decolorant II de Coomassie Blue:  
5% (v/v) metanol i 7% (v/v) d'àcid acètic.

## B. SOLUCIONS GENERALS EMPRADES EN LA MANIPULACIÓ DE CÈL·LULES EUCARIOTES

- ❖ Tampó de càrrega no desnaturalitzant per resoldre les mostres de cDNA dels experiments de RT-PCR semiquantitativa:  
0.25% (p/v) blau de bromofenol, 0.25% (p/v) xylene cyanol FF i 40% (v/v) sacarosa. Deixar agitant tot el dia fins a la completa dissolució.
- ❖ TBE 5X (Tris-base/Borat/EDTA):  
445 mM Tris, 445 mM àcid boric i 10 mM EDTA 0.5 M pH 8.0.
- ❖ Gel d'acrilamida al 6% per resoldre les PCR semiquantitatives de RCAN1 i RCAN3:

- 15% acrilamida 29:1 preparada comercialment al 40%, 20% (v/v) TBE 5X, 0,72% (v/v) APS i 0,12% (v/v) TEMED.
- ❖ Tampons HeBS 2X per transfectar cèl·lules eucariotes mitjançant el mètode del fosfat càlcic:  
0.28 M NaCl, 0.05 M àcid HEPES i 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Ajustar el pH amb NaOH dins del rang de 7.05 fins 7.12. Filtrar a 0.22 µM.
  - ❖ Tampó de lisi de cèl·lules Jurkat per obtenir un extracte proteic soluble que després es farà servir pels assaigs de co-IP de RCAN1-1-CnA $\alpha$ :  
50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tritó X-100, 0.5 mM EDTA, 10 mM iodoacetamida (IAM), 1mM PMSF, 10 mM pirofosfat sòdic (NaPPi), 1 mM ortovanadat de sodi, 2 mM CaCl<sub>2</sub> i una barreja d'inhibidors de proteases sense EDTA 1X (Roche).
  - ❖ Tampons de lisi de cèl·lules COS-7 i HEK 293T per obtenir un extracte proteic soluble que després es farà servir pels assaigs de co-IP RCAN3-2-CnA:
    1. Tampó amb CHAPS: 0.01 M tampó fosfat pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 2 mM EDTA, 50 mM fluorur de sodi, 0.2 mM ortovanadat de sodi i aprotinina 2 µg/ml.
    2. Tampó amb IGEPAL (conegut abans com NP-40): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, NaCl 100 mM, 1% (v/v) IGEPAL, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM ortovanadat de sodi i una barreja d'inhibidors de proteases sense EDTA 1X (Roche).
  - ❖ Tampó de lisi de cèl·lules Jurkat per obtenir un extracte proteic soluble que després es farà servir pels assaigs de *pull down*:  
50 mM TrisHCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadat sòdic, 1% (v/v) IGEPAL i una barreja d'inhibidors de proteases sense EDTA 1X (Roche).
  - ❖ Tampó de Transferència 10X de SDS-PAGE:  
250 mM Tris-HCl pH 8.3, 1920 mM glicina. Portar a 1X i afegir 20% (v/v) metanol.
  - ❖ Solució colorant de proteïnes Ponceau S:  
0.5 gr en 1 ml d'àcid acètic glacial. Afegir 99 ml d'aigua destil·lada.
  - ❖ Solució de bloqueig de membranes de nitrocel·lulosa per fer transferència de *Western*:  
1% (p/v) BSA, 1% (p/v) polietilenglicol 8.000 (PEG), 1% (p/v) polivinil pirrolidona 360.000 (PVP) i 0.2 % (v/v) de Tween-20 en PBS 2X.
  - ❖ Substrat de la  $\beta$ -galactosidasa pels assaigs de promotors amb el gen marcador de la luciferasa:  
0.1 M fosfat de sodi pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub> i 0.9 mg/ml o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranòsid (ONPG, Sigma-Aldrich).

Tots aquells reactius dels quals no es detalla la preparació van ser preparats seguint les instruccions de la casa comercial, en cada cas, i respectant les condicions de solubilitat i emmagatzematge de cada producte, indicades en les fulles d'informació corresponents.





## RESULTATS



Fins al començament d'aquest treball experimental, s'havien publicat diversos articles descrivint que RCAN1 interaccionava amb Cn i inhibia la seva activitat fosfatasa vers els factors de transcripció NFAT. Cap d'aquests estudis s'havia fet a limfòcits T humans i a més no s'havia caracteritzat cap dels motius de les RCAN implicats en aquesta interacció. En aquest context es va decidir avaluar l'efecte de les proteïnes RCAN vers la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT a limfòcits T humans.

El treball realitzat en aquesta Tesi consta de tres apartats :

- 1.- Caracterització funcional de la interacció RCAN1-calcineurina a limfòcits T humans.
- 2.- Caracterització funcional de la interacció RCAN3-calcineurina a limfòcits T humans.
- 3.- Avaluació del pèptid C18 de les RCAN com a eina per la cerca de noves molècules amb potencial immunosupressor.

La major part de resultats obtinguts en els punts número 1 i 2 han estat publicats en forma d'articles (Article 1 i 2, respectivament). A més, també s'han obtingut altres resultats, però per diversos motius, no han estat inclosos en les citades publicacions. En aquesta memòria els resultats publicats corresponents als punts 1 i 2 es descriuran breument, seguidament s'adjuntarà l'article i per últim, en format d'annex s'afegiran els resultats no publicats.

Pel que fa als resultats corresponents al punt número 3, donat que no han estat publicats, es descriuran detalladament.

**Nota aclaridora de la nomenclatura emprada:**

En els darrers anys, els membres de la família de les proteïnes RCAN han rebut diferents noms, DSCR, MCIP, ADAPT78, CALP i calcipressin. L'any 2007, es va unificar la nomenclatura i es va decidir anomenar-les proteïnes RCAN (Davies et al., 2007). En el text d'aquesta memòria s'ha emprat aquesta nomenclatura, però els dos articles que s'inclouen, realitzats prèviament a la publicació de l'article de Davies i col., inclouen una nomenclatura que no es correspon amb l'actual.

A l'Article 1, la proteïna CALP1 correspon a la isoforma RCAN1-1. A l'Article 2, el transcrit *RCAN3* correspon al *RCAN3-1,2,3,4,5* i la proteïna RCAN3-1 correspon a la isoforma RCAN3-2, segons la nova nomenclatura acceptada.



## **1. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ RCAN1-CALCINEURINA A LIMFÒCITS T HUMANS**



En els darrers anys, s'han anat identificant i caracteritzant diferents inhibidors endògens de Cn, entre ells la família de proteïnes RCAN. Tot i que diversos autors apuntaven a la importància de RCAN1 en la regulació de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT en alguns teixits, res no s'havia demostrat a limfòcits T humans. A més, la caracterització molecular i funcional del motiu o motius de RCAN1 implicats en l'establiment de la interacció amb Cn tampoc havia estat estudiada en detall. Amb aquests dos objectius principals es va dur a terme el treball presentat a l'Article 1.

Inicialment, es va voler determinar si la interacció RCAN1-1-Cn té lloc *in vivo* a limfòcits T humans. Les dades obtingudes mostren que tant la proteïna RCAN1-1 endògena com la proteïna HA-RCAN1-1 sobreexpressada interaccionen *in vivo* amb la subunitat catalítica de la Cn, anomenada CnA, en les línies cel·lulars de limfòcits T humans Jurkat i HuT 78 (Article 1, Figura 1).

Per tal d'identificar la regió de RCAN1-1 implicada en aquesta interacció es va realitzar una anàlisi exhaustiva de la seqüència de RCAN1-1. Els resultats obtinguts mostren que RCAN1-1 s'uneix a CnA a través de dues regions de manera independent. Una d'elles, s'assembla al motiu consens PxlxIT d'ancoratge dels NFAT en Cn i per això s'ha anomenat motiu consens PxlxxT de les RCAN. Aquest motiu PxlxxT de les RCAN comprèn els aminoàcids 234-246 de RCAN1-1. La segona regió s'ha anomenat motiu ELHA i comprèn els residus 198-210 de RCAN1-1. A més, aquests assaigs també mostren que el motiu FLISPP que comprèn els aminoàcids 160-169 no participa de manera directe en la unió a CnA (Article 1, Figura 2). Aquesta treball ha estat realitzat per Anna Aubareda.

Amb la finalitat d'analitzar quin motiu és el responsable de l'efecte inhibidor de RCAN1-1 sobre la via de  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT es van dur a terme assaigs de localització cel·lular de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina (ionòfor de  $Ca^{2+}$ ) que promou l'increment en la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular. Els resultats indiquen que ni el motiu FLISPP, ni el motiu ELHA ni la regió que inclou el motiu PxlxxT són suficients com per inhibir la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades (Article 1, Figura 3). Aquest efecte inhibidor únicament es detecta quan el motiu ELHA està en un context més ampli. A aquest nou motiu inhibidor de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT se l'ha anomenat motiu CIC (per *calcineurin-inhibitor CALP1* (o *RCAN1*) *motif*). El motiu CIC (aminoàcids 191-218) és la regió mínima de RCAN1-1 publicada fins al moment amb efecte inhibidor sobre la translocació nuclear de NFAT.

Finalment, per avaluar l'efecte inhibidor del motiu CIC sobre l'expressió gènica dependent de NFAT es va analitzar el nivell d'expressió de diverses citoquines en cèl·lules Jurkat humanes estimulades mitjançant l'administració de ionomicina juntament amb un activador de la proteïna quinasa C (PMA). Els resultats obtinguts indiquen que el motiu CIC és el responsable directe de la disminució significativa del nivell d'expressió d'aquests gens (Article 1, Figura 4).

Totes aquestes dades en limfòcits T humans suggereixen una nova funció per RCAN1-1 com a inhibidor de l'activació limfocitària i, per tant, de la resposta immunitària.





## ARTICLE 1

Article 1: “Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells”

Cellular Signalling 18: 1430-1438 (2006)

Anna Aubareda\*, M<sup>a</sup> Carme Mulero\* i Mercè Pérez-Riba

(\* , comparteixen co-autoria)

**Contribució:** Determinació de la interacció RCAN1-1-Cn mitjançant assaigs de co-immunoprecipitació; realització de diverses construccions de RCAN1-1 fusionades a GST i a EGFP i de la construcció *PHA-NFAT1-EYFP* emprades en els assaigs *pull down* i d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT; realització dels assaigs d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT; determinació del nivell d'expressió gènica de diverses citoquines mitjançant PCR a temps real.



## ANNEX I

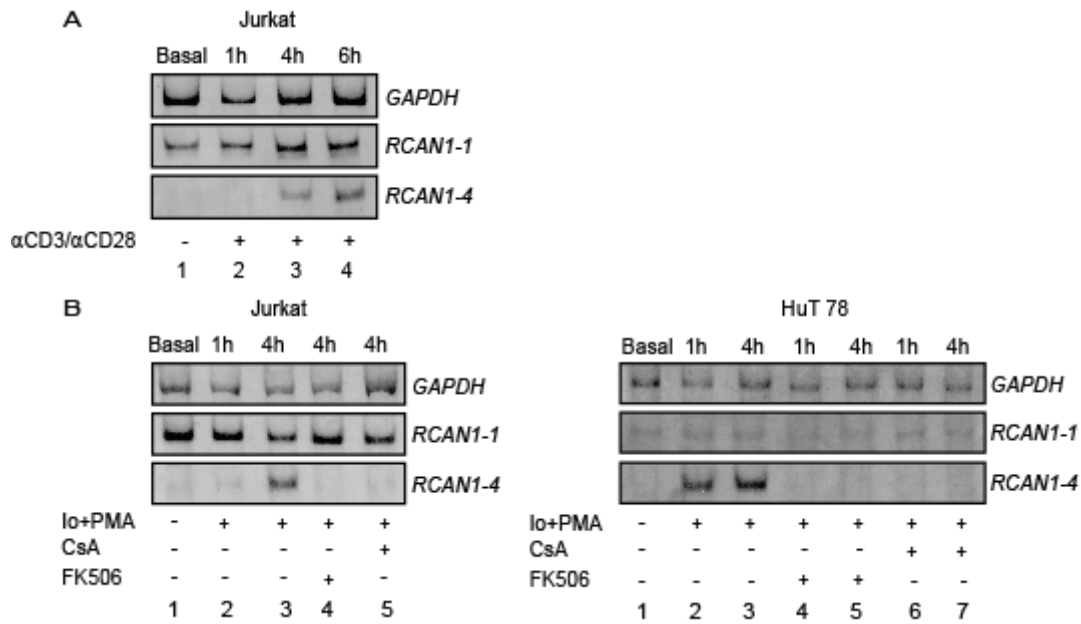
### ❖ Regulació de l'expressió gènica de *RCAN1* en línies cel·lulars de limfòcits T humans

Abans de determinar que la interacció *RCAN1-1-Cn* s'estableix de manera endògena en cèl·lules Jurkat i HuT 78 (Article 1, Figura 1), es va haver de confirmar que el mRNA de *RCAN1* s'expressa a nivell basal en aquestes línies cel·lulars. Per *splicing* alternatiu, *RCAN1* dona lloc a 4 transcrits diferents, essent els més abundants *RCAN1-1* i *RCAN1-4*. Mitjançant assaigs de RT-PCR semiquantitativa s'ha demostrat que *RCAN1-1* s'expressa de manera endògena en cèl·lules Jurkat i en HuT 78 mentre que *RCAN1-4*, no (Annex I, Figura 15, comparar els carrils 1 de *RCAN1-1* respecte *RCAN1-4* en tots els gels).

Treballs anteriors han descrit que ambdós transcrits, *RCAN1-1* i *RCAN1-4*, tenen promotors alternatius (Fuentes et al., 1997). Mentre que el de *RCAN1-4* conté 15 llocs d'unió a factors de transcripció NFAT dins dels ≈900 pb localitzats abans del primer nucleòtid de l'exó 4 (Yang et al., 2000a), *RCAN1-1* només en té 4 en aquesta regió (dades no mostrades). Tenint en compte aquestes dades es va voler determinar si l'expressió dels transcrits de *RCAN1* podia estar regulada a través de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT. Per això, es van estimular cèl·lules Jurkat a través del receptor de cèl·lules T (TCR) amb anti-CD3 i anti-CD28 durant 6 hores i es va analitzar l'expressió dels transcrits a diferents temps (Annex I, Figura 15A). Tal i com es mostra a la Figura 15, els nivells d'expressió gènica del transcrit *RCAN1-1* es mantenen constants durant tot l'assaig, mentre que els de *RCAN1-4* incrementen significativament a partir de les 4 hores d'estimulació (Annex I, Figura 15A, comparar els carrils 1, 2, 3 i 4 de *RCAN1-1* respecte *RCAN1-4*). Resultats similars es van obtenir amb cèl·lules Jurkat o HuT 78 estimulades mitjançant l'administració de ionomicina+PMA durant 4 hores (Annex I, Figura 15B, comparar els carrils 1, 2 i 3 de *RCAN1-1* respecte *RCAN1-4* en Jurkat i HuT 78). Aquests resultats indiquen que l'expressió gènica de *RCAN1-4* és depenent dels nivells intracel·lulars de  $Ca^{2+}$ , mentre que la de *RCAN1-1*, no.

Per saber si aquest increment en la transcripció de *RCAN1-4* implica la participació de Cn, es van realitzar els mateixos assaigs d'estimulació amb ionomicina+PMA però en presència d'inhibidors de Cn, ciclosporina A (CsA) o FK506. En les dues línies cel·lulars, la presència dels inhibidors de Cn provoca la disminució significativa dels nivells de *RCAN1-4*, mentre que no causa cap efecte en els nivells de *RCAN1-1* (Annex I, Figura 15B, comparar els carrils 4 i 5 respecte el 3 en Jurkat i els carrils 4, 5, 6 i 7 respecte el 2 i el 3 en HuT 78, de *RCAN1-1* i *RCAN1-4*, respectivament). Aquestes dades mostren que l'increment en l'expressió de *RCAN1-4* en limfòcits T promoguda després d'un augment en la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular està mediada per Cn.

En tots els casos, l'expressió gènica de *GAPDH* va ser considerada el control de càrrega de l'assaig.



**Figura 15.** A. Expressió i regulació de l'expressió de *RCAN1-1* i *RCAN1-4* a cèl·lules Jurkat estimulades a través del receptor de cèl·lules T (TCR) mitjançant l'ús d'anti-CD3 i anti-CD28. B. Regulació de la transcripció de *RCAN1-1* i *RCAN1-4* a cèl·lules Jurkat i HuT 78 estimulades amb ionomicina+PMA. A la Figura, Io, significa ionomicina. L'expressió gènica de *GAPDH* va ser el control de l'assaig

## **2. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ RCAN3-CALCINEURINA A LIMFÒCITS T HUMANS**



L'any 2000, Strippoli i col. van publicar un article en el qual descriuen mitjançant una anàlisi bioinformàtica l'existència d'una nova família de proteïnes conservada des de llevats a humans, la família de les RCAN (Strippoli et al., 2000a). Aquesta família incloïa RCAN1, RCAN2 i un tercer membre, RCAN3, predit també bioinformàticament per ells. La mateixa aproximació va ser seguida per a caracteritzar els membres de la família de les Rcan en ratolí (Strippoli et al., 2000b). Fins a la realització d'aquest treball experimental no s'havia dut a terme cap assaig funcional on participés RCAN3. Únicament s'havia descrit la interacció de RCAN3 amb la subunitat inhibidora específica de cor del complex de la troponina (TNNI3), suggerint algun paper en la contracció cardíaca (Canaider et al., 2006).

L'efecte inhibidor descrit per RCAN1 sobre la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT a limfòcits T humans (Aubareda et al., 2006), juntament amb la gran conservació a nivell d'aminoàcids que mostren les RCAN, sobretot en la seva regió central i C-terminal, en la qual s'hi troba localitzat el motiu CIC, van ser les dues raons principals per les quals es va iniciar la caracterització de l'efecte funcional de RCAN3 envers aquest via de senyalització.

Prèviament al treball experimental es va realitzar una anàlisi genòmica comparativa de totes les RCAN presents a l'*Eukarya*. Els resultats obtinguts mostren que la major identitat present als eucariotes es restringeix al motiu FLISPP, mentre que els motius CIC i PxlxxT només es troben a les RCAN de vertebrats (Article 2, Figura 1A). A més, el multialineament de totes les seqüències de les RCAN ha evidenciat que les regions central i C-terminal en vertebrats estan molt conservades i que mentre que en vertebrats existeixen tres paràlegs, a la resta de membres de la família només hi ha un (Article 2, Figura Suplementària). Totes aquestes dades ens han portat a proposar l'existència en vertebrats d'una nova subfamília de proteïnes RCAN estretament relacionada des d'un punt de vista funcional. Per altra banda l'anàlisi filogenètica de les RCAN en vertebrats indica que RCAN2 i RCAN3 són més homòlegs entre ells que no pas respecte RCAN1 (Article 2, Figura 1B). Aquest treball ha estat realitzat per la Dra. Àgatha Schlüter (CGMM-IDIBELL, Barcelona).

A continuació es va estudiar el paper funcional de RCAN3-2 a limfòcits T humans. En primer lloc es va determinar la seva expressió a nivell basal en cèl·lules Jurkat i la seva regulació transcripcional. Els resultats obtinguts mostren que el transcrit *RCAN3-1,2,3,4,5* s'expressa endògenament a Jurkat però la seva expressió no depèn de la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular (Article 2, Figura 2A).

Amb la finalitat de determinar si RCAN3-2 i Cn interaccionen es van dur a terme assaigs *pull down* que a més també ens van permetre acotar la regió d'interacció de RCAN3-2 amb Cn. Els resultats obtinguts indiquen que la unió RCAN3-2-Cn s'estableix i que l'únic motiu de RCAN3-2 que intervé de manera directa en la interacció és el motiu CIC que comprèn els aminoàcids 178-203. A l'igual que passa amb RCAN1-1, el motiu FLISPP no és necessari per la interacció d'ambdues proteïnes. Però a diferència de RCAN1-1, aquests experiments de *pull down* han demostrat que RCAN3-2 no interacciona amb Cn a través del seu motiu PxlxxT (Article 2, Figura 2D). De fet el motiu consens PxlxxT de RCAN3-2 conté un canvi d'aminoàcid

en la primera posició. Ambdós resultats mostren que RCAN3-2 no conté cap motiu consens PxlxxT real.

Seguidament, es va determinar l'efecte funcional de RCAN3-2 sobre la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina. Les dades obtingudes mostren que el motiu CIC és l'únic responsable de la inhibició d'aquesta translocació (Article 2, Figura 3). A més, l'efecte inhibidor de RCAN3-2 sembla selectiu donat que inhibeix l'expressió del gen marcador de la luciferasa quan aquest es troba sota la regulació d'un promotor que conté diversos llocs d'unió a NFAT però no quan el promotor conté diversos llocs d'unió a NFκB (Article 2, Figura 4A).

Per últim, el motiu CIC de RCAN3-2 és el responsable de la inhibició de l'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT i també de l'expressió gènica de *RCAN1-4* que també s'ha demostrat que és dependent de la via Cn-NFAT en cèl·lules Jurkat (Article 2, Figura 4B i 4C).

Totes aquestes dades apunten a que el motiu CIC de RCAN3-2, a l'igual que s'ha descrit amb el corresponent de RCAN1-1, inhibeix l'activació limfocitària, i per tant, podria tenir un paper immunosupressor en limfòcits T humans.

#### **Fe d'errates de l'Article 2:**

Per error les construccions de RCAN3-2 mostrades a la Figura 2C no tenen la numeració correcte. A continuació, es detalla a la columna de l'esquerre el nom de la construcció descrita a l'article i a la dreta el nom correcte de cadascuna de les construccions:

#### **Article**

-RCAN3 2-241

-RCAN3 2-175

-RCAN3 2-143

-RCAN3 174-241

-RCAN3 210-241

-RCAN3 177-202

#### **Correcte**

-RCAN3 2-241

-RCAN3 2-176

-RCAN3 2-144

-RCAN3 175-241

-RCAN3 211-241

-RCAN3 178-203



## ARTICLE 2

Article 2: “RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression ”

Molecular Cell Research-Biochimica et Biophysica Acta 1773: 330-341 (2007)

M<sup>a</sup> Carme Mulero, Anna Aubareda, Ágatha Schlüter i Mercè Pérez-Riba

**Contribució:** Determinació de l'expressió gènica de *RCAN3-1,2,3,4,5* i de la seva regulació per  $Ca^{2+}$  a la línia cel·lular Jurkat mitjançant RT-PCR semiquantitativa; realització de les construccions GST-RCAN3(178-203) i EGFP-RCAN3(178-203); assaigs d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT; anàlisi de l'expressió de la luciferasa sota el control de promotors amb elements de resposta a NFAT o NFκB; determinació del nivell d'expressió gènica de diverses citoquines i de *RCAN1-4* mitjançant PCR a temps real.

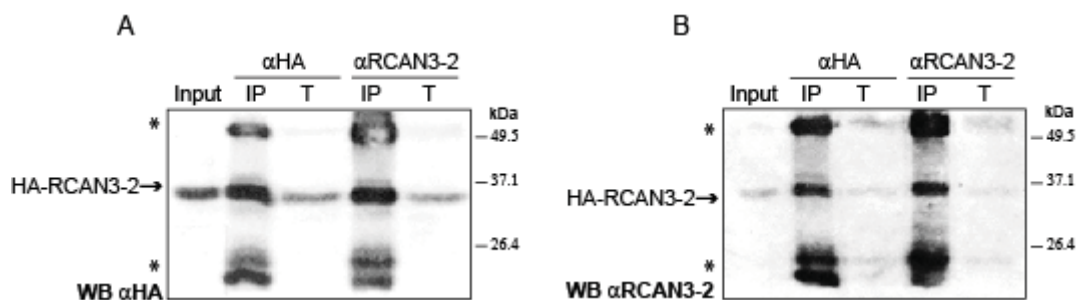


## ANNEX II

### ❖ Caracterització d'un anticòs policlonal anti-RCAN3-2 generat en ratolí

Fins al moment de realitzar aquest treball no hi havien anticòssos que detectessin específicament la isoforma RCAN3-2. Per això es va decidir desenvolupar al laboratori un anti-RCAN3-2 policlonal en líquid ascític de ratolí. Aquest anticòs es va generar contra la part N-terminal de la proteïna, donat que és la regió no conservada entre les tres RCAN humanes i que conté una seqüència altament immunogènica. La generació de l'anticòs va ser realitzada principalment per la Dra. Mercè Pérez-Riba i l'anàlisi de l'anticòs va ser feta per la doctoranda.

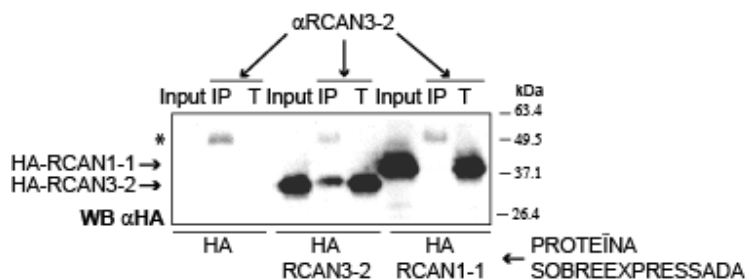
En primer lloc, es va analitzar la capacitat de l'anti-RCAN3-2 de reconèixer la proteïna sobreexpressada HA-RCAN3-2 en cèl·lules eucariotes. En extractes proteics solubles de cèl·lules COS-7 que expressaven HA-RCAN3-2 es va determinar que l'anti-RCAN3-2 és capaç d'immunoprecipitar una proteïna que pesa al voltant de 34 kDa que correspon a HA-RCAN3-2 de manera similar a com ho fa l'anti-HA (Annex II, Figura 16A, veure carrils corresponents a les immunoprecipitacions (IP)). A més, l'anti-RCAN3-2 també detecta per transferència de *Western* la proteïna transfectada HA-RCAN3-2 (Annex II, Figura 16B). El control de l'assaig va consistir en realitzar paral·lelament immunoprecipitacions emprant immunoglobulines que no reconeixen la proteïna HA-RCAN3-2 i el resultat va mostrar que les immunoprecipitacions detectades amb anti-HA i anti-RCAN3-2 eren específiques (dades no mostrades).



**Figura 16.** L'anti-RCAN3-2 és capaç d'immunoprecipitar i detectar per transferència de *Western* la proteïna HA-RCAN3-2 sobreexpressada. IP, significa immunoprecipitació. T, significa través. Els asteriscs corresponen a les immunoglobulines d'alt i baix pes molecular, respectivament.

Per determinar que l'anticòs anti-RCAN3-2 reconeixia RCAN3 però no RCAN1, es van transfectar cèl·lules HEK 293T amb HA, HA-RCAN1-1 o HA-RCAN3-2, respectivament, i es van realitzar immunoprecipitacions amb l'anti-RCAN3-2 (Annex II, Figura 17). L'anti-RCAN3-2 immunoprecipita específicament la proteïna HA-RCAN3-2 mentre que no reconeix la proteïna

HA-RCAN1-1 (Annex II, Figura 17 comparar els carrils IP de les cèl·lules que expressen HA-RCAN3-2 respecte de les que expressen HA-RCAN1-1).

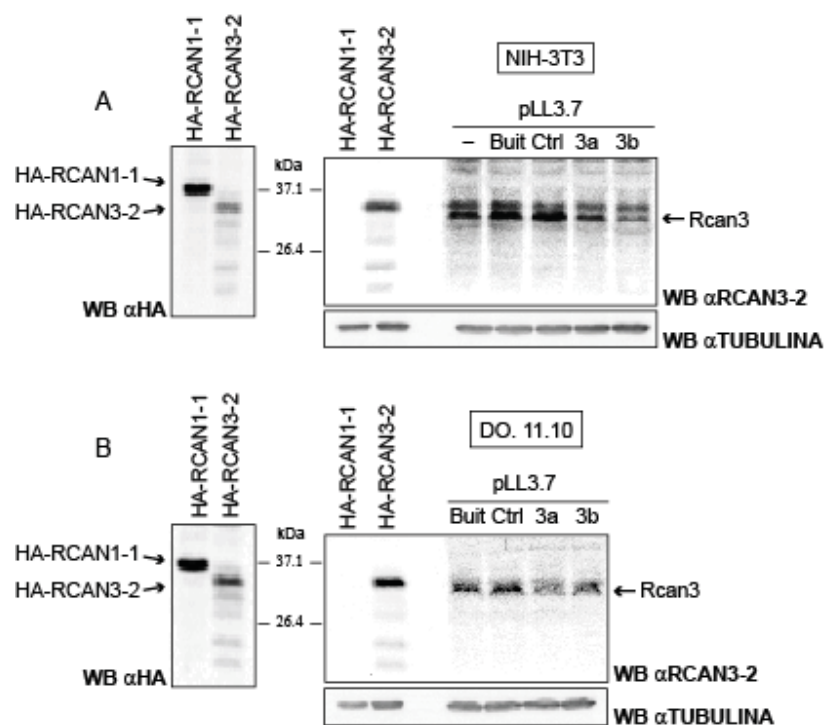


**Figura 17** L'anti-RCAN3-2 immunoprecipita específicament la proteïna HA-RCAN3-2 sobreexpressada però no la HA-RCAN1-1. L'asterisc correspon a la immunoglobulina d'alt pes molecular.

A més, la detecció per transferència de *Western* de HA-RCAN3-2 mostrada anteriorment a la Figura 16B també és específica perquè l'anti-RCAN3-2 no és capaç de detectar HA-RCAN1-1, tot i estar-se expressant més aquesta proteïna respecte HA-RCAN3-2, tal i com es mostra en les membranes controls hibridades amb anti-HA a la Figura 18 (Annex II, Figura 18A i 18B, comparar carrils corresponents a HA-RCAN1-1 i RCAN3-2 en les membranes detectades amb anti-HA i anti-RCAN3-2, respectivament).

Fins al moment s'havia caracteritzat la capacitat de l'anti-RCAN3-2 d'immunodetectar i d'immunoprecipitar la proteïna HA-RCAN3-2 sobreexpressada. Amb la finalitat d'analitzar la capacitat de l'anti-RCAN3-2 de detectar la proteïna RCAN3-2 endògena vam establir una col·laboració amb el grup del Dr. Yosef Refaeli (Department of Pediatrics, National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO, USA). Aquest grup disposa de dues línies cel·lulars de ratolí, NIH-3T3 (fibroblasts embrionaris) i DO.11.10 (hibridoma de cèl·lules T), transduïdes utilitzant lentivirus que expressen de manera estable dos shRNA (per *short hairpin RNA*) diferents clonats en el vector pLL3.7 (Addgene, Cambridge, MA, USA), anomenats shRNA-Csp3a i shRNA-Csp3b. En la nomenclatura d'aquests plasmidis Csp3 significa Rcan3. Aquestes línies van ser cultivades per la Dra. Mercè Pérez Riba, se'n va obtenir l'extracte proteic soluble i es van carregar 100 µg de cadascuna en un SDS-PAGE al 10%. En el cas de les cèl·lules NIH-3T3 es van utilitzar tres mostres com a control negatiu del silenciament: cèl·lules sense transduir (-), transduïdes amb el vector pLL3.7 buit sense cap shRNA clonat (Buit) o transduïdes amb el vector pLL3.7 que conté un shRNA control que no silencia Rcan3 (Ctrl). Pel que fa a l'hibridoma DO.11.10, només vam emprar dos controls del silenciament: cèl·lules transduïdes amb el vector pLL3.7 buit (Buit) o amb el shRNA control (Ctrl). No es va poder fer servir l'hibridoma sense transduir perquè l'aliquota de cèl·lules que ens van enviar no va créixer adequadament. En ambdues línies, NIH-3T3 i DO.11.10 s'observa com una única banda desapareix significativament en les mostres silenciades amb els shRNA-Csp3a i shRNA-Csp3b (Annex II, Figura 18A i 18B, comparar carrils 3a i 3b respecte dels carrils

control, respectivament). Aquestes bandes van ser quantificades amb el programa *Quantity one* (Bio-Rad) juntament amb les de tubulina, emprada com a control de càrrega. Els resultats obtinguts indiquen que en les cèl·lules NIH-3T3, el shRNA-Csp3a disminueix l'expressió de Rcan3 un 54% mentre que el shRNA-Csp3b la disminueix un 72%. En canvi, en l'hibridoma DO.11.10. el silenciament és menor i tant el shRNA-Csp3a com el shRNA-Csp3b disminueixen només un 30% l'expressió de Rcan3. Aquests resultats han permès determinar que l'anti-RCAN3-2 generat reconeix tant la proteïna RCAN3-2 humana sobreexpressada com la proteïna Rcan3 endògena murina. A més, la mobilitat electroforètica de la proteïna Rcan3 és major que la de les proteïnes HA-RCAN1-1 i HA-RCAN3-2, també detectades en la mateixa membrana, i la seva massa molecular podria estar al voltant dels 30 kDa (Annex II, Figura 18A i 18B, veure la proteïna Rcan3 indicada amb una fletxa).

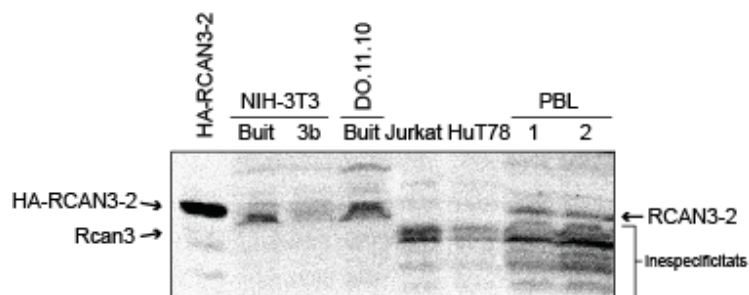


**Figura 18.** L'anticòs anti-RCAN3-2 reconeix la proteïna Rcan 3 endògena en la línia cel·lular murina NIH-3T3 i en l'hibridoma DO.11.10. El símbol (-), correspon a les cèl·lules no transduïdes; Buit, correspon a les cèl·lules transduïdes amb el vector pLL3.7 sense cap shRNA clonat; Ctrl, correspon a les cèl·lules transduïdes amb el vector pLL3.7 que inclou un shRNA que no silencia Rcan3; 3a i 3b, corresponen a les cèl·lules transduïdes amb el vector pLL3.7 que conté els shRNA-Csp3a i shRNA-Csp3b, respectivament, responsables del silenciament de Rcan3.

Un cop demostrat que l'anti-RCAN3-2 detecta la proteïna Rcan3 endògena es va analitzar si aquest anticòs també detecta la proteïna RCAN3-2 endògena en limfòcits T humans, emprant les línies cel·lulars Jurkat i HuT 78, i limfòcits de sang perifèrica (PBL, per

*peripheral blood leukocytes*) extrets de dos pacients control cedits amablement pel Dr. Fèlix Rueda (CGMM-IDIBELL, Barcelona) (Annex II, Figura 19). A mode de control, es van carregar en el mateix gel: la proteïna transfectada HA-RCAN3-2, mostres de les cèl·lules murines NIH-3T3 i de l'hibridoma DO.11.10 transduïdes amb el vector pLL3.7 buit i cèl·lules NIH-3T3 silenciades amb el shRNA-Csp3b. Ni les cèl·lules Jurkat ni les HuT 78 (cada carril conté 100 µg de proteïna) mostren cap banda a l'alçada de la banda que apareix en les cèl·lules transduïdes establement amb el vector pLL3.7 buit (Annex II, Figura 19, comparar carrils de Jurkat i HuT 78 respecte de les mostres control). En canvi, en ambdós pacients (200 µg de proteïna per carril) apareix una banda a la mateixa alçada que la banda detectada en les línies cel·lulars murines i que podria correspondre a la proteïna endògena RCAN3-2 humana (Annex II, Figura 19, veure carrils dels pacients 1 i 2). Aquest resultat caldria que fos confirmat utilitzant un altre anticòs anti-RCAN3 generat pel grup de la Dra. Mariona Arbonés (Centre de Regulació Genòmica, Barcelona) i que ens han cedit amablement fa poc temps (Porta et al., 2007a).

Cal destacar que en totes les línies cel·lulars analitzades per caracteritzar la proteïna RCAN3-2 endògena, l'anti-RCAN3-2 ha mostrat un alt nivell d'inespecificitat apareixent bandes preferentment per sobre de 55 kDa, tant en les línies humanes com en les murines, i per sota de 30 kDa, únicament en les línies cel·lulars humanes i en els PBL.



**Figura 19.** L'anticòs anti-RCAN3-2 reconeix una banda a limfòcits de sang perifèrica humans (PBL) que mostra una mobilitat electroforètica similar a la de la proteïna murina Rcan3.

## ANNEX III

### ❖ Determinació *in vivo* de la interacció RCAN3-2-Cn

Per tal de determinar si RCAN3-2 i Cn interaccionen *in vivo*, es va transfectar HA-RCAN3-2 en cèl·lules HEK 293T i es van realitzar co-immunoprecipitacions (co-IP) amb anti-RCAN3-2 i anti-CnA.

Inicialment, aquests assaigs es van realitzar emprant el mateix tampó de lisi cel·lular que s'havia utilitzat per detectar mitjançant co-IP la interacció RCAN1-1-Cn. Aquest tampó incloïa un 1% (v/v) de detergent Tritó X-100 i en aquestes condicions no vam poder detectar la interacció entre ambdues proteïnes, tot i que els controls inclosos en els assaigs van mostrar que havien estat realitzats correctament (dades no mostrades). Per això, es va decidir canviar el detergent del tampó de lisi i es van provar dos de diferents: tampó de lisi amb CHAPS i tampó de lisi amb IGEPAL (anteriorment conegut com NP-40) (Veure condicions de preparació, Capítol IV). En presència d'ambdós detergents, es va detectar que tant l'anti-RCAN3-2 com l'anti-CnA co-immunoprecipiten CnA i HA-RCAN3-2 (Annex III, Figura 20, comparar els carrils IP respecte els T en totes les co-IP), mentre que l'utilització com a control d'immunoglobulines que no reconeixen la proteïna HA-RCAN3-2, no ho fan (dades no mostrades). Aquests resultats mostren que la CnA endògena interacciona *in vivo* amb la proteïna HA-RCAN3-2 sobreexpressada.

Prèviament a conèixer el problema que suposava utilitzar el detergent Tritó X-100 en aquest tipus d'assaig, es van realitzar co-IP per determinar la interacció entre CnA i RCAN3-2 endògenes, però en aquelles condicions no es va detectar la interacció entre ambdues proteïnes.

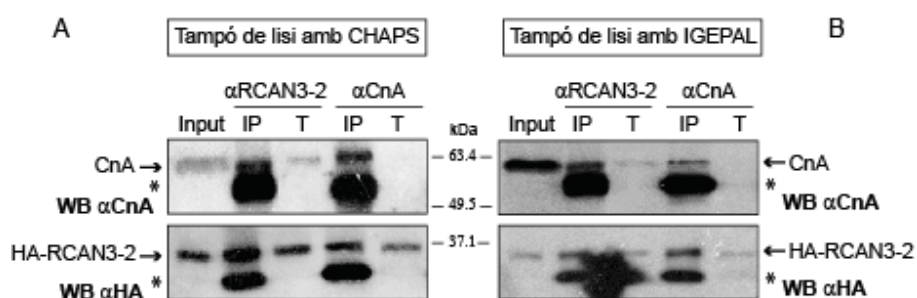


Figura 20. A i B. Determinació de la interacció RCAN3-2-Cn *in vivo* emprant tampons de lisi amb detergents diferents, CHAPS i IGEPAL, respectivament. IP, significa immunoprecipitat. T, significa través. Les immunoglobulines pesades i lleugeres estan indicades en les imatges amb asteriscs.

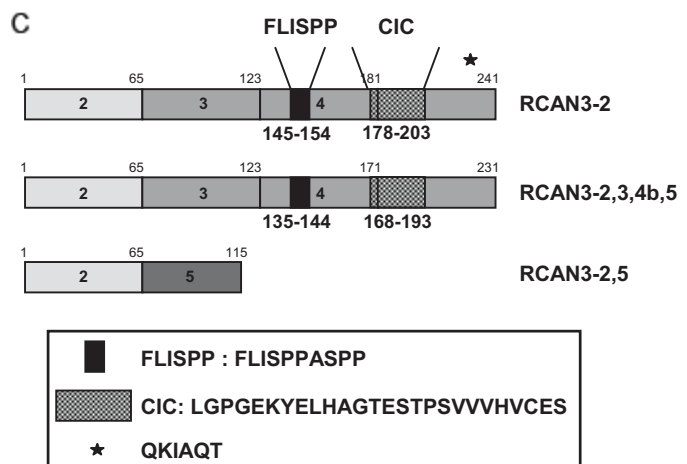
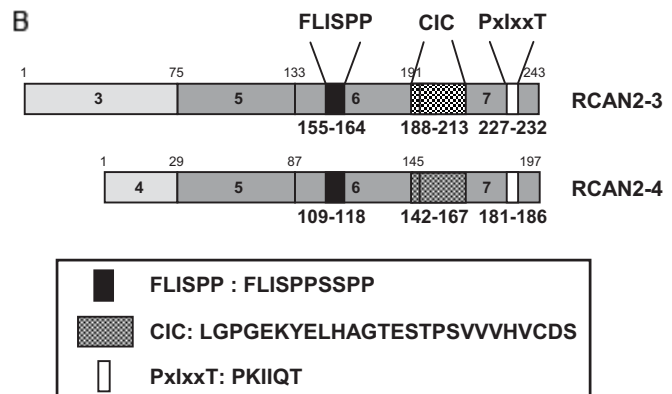
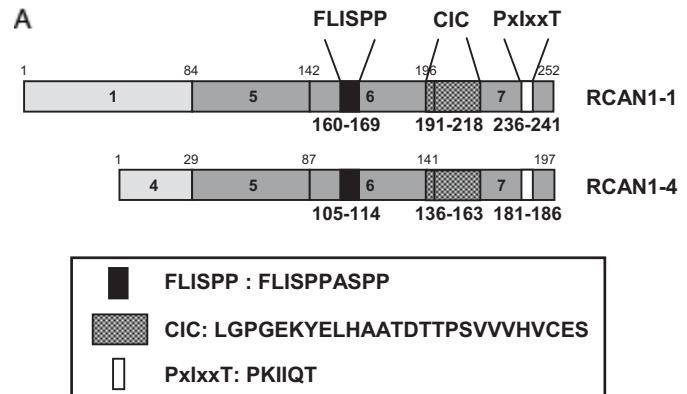
## ANNEX IV

### ❖ Motius de les RCAN caracteritzats fins al moment

Aquest treball experimental ha portat a la caracterització funcional de l'efecte inhibidor del motiu CIC de les RCAN vers la via de senyalització Cn-NFAT.

Aquestes dades, juntament amb d'altres obtingudes al laboratori permeten completar les estructures de les tres proteïnes RCAN humanes presentades a l'apartat de la Introducció. L'esquema de les tres proteïnes així com la localització dels tres motius de les RCAN caracteritzats, el FLISPP, el CIC i el PxlxxT, es troben indicats en detall a la Figura 21.

**Figura 21.** Esquema representatiu de les isoformes de les tres RCAN humanes, RCAN1 (A), RCAN2 (B) i RCAN3 (C). En gris fosc es mostren els exons comuns per a cada RCAN, mentre que en gris clar s'indica l'exó 1 de cada isoforma. En el cas particular de RCAN3, els exons 5 estan representats en diferents tons de gris, ja que la isoforma RCAN3-2,5 conté un exó 5 amb una pauta de lectura diferent als exons 5 de les altres dues isoformes. El quadre negre correspon al motiu FLISPP, el ratllat al motiu CIC i el blanc al motiu PxlxxT. En el cas de RCAN3, l'estrella indica que aquesta isoforma no conté el motiu PxlxxT a la seva seqüència. En tots els casos, s'indica el número d'aminoàcids que comprèn cada isoforma de cada proteïna, cada exó individual i cada motiu representat. La seqüència dels motius de les RCAN es mostra en detall en el quadre.





### **3. AVALUACIÓ DEL PÈPTID C18 DE LES RCAN COM A EINA PER LA CERCA DE NOVES MOLÈCULES AMB POTENCIAL IMMUNOSUPRESSOR**



Actualment, els protocols utilitzats en la teràpia del trasplantament i en el tractament de les malalties autoimmunes, inclouen l'administració de fàrmacs inhibidors de la Cn, CsA i FK506. Malgrat el seu potent efecte immunosupressor la seva administració continuada comporta l'aparició d'efectes secundaris adversos greus. Per això és necessari identificar noves molècules amb potencial immunosupressor que puguin ser emprades de manera alternativa als fàrmacs actuals.

Donat que els nostres resultats van mostrar que el motiu CIC de RCAN1 i RCAN3 té una funció inhibidora vers la via de senyalització Cn-NFAT a limfòcits T humans (Articles 1 i 2), es va desenvolupar un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció RCAN-Cn per tal d'identificar molècules amb potencial terapèutic a partir de quimiotèques combinatòries.

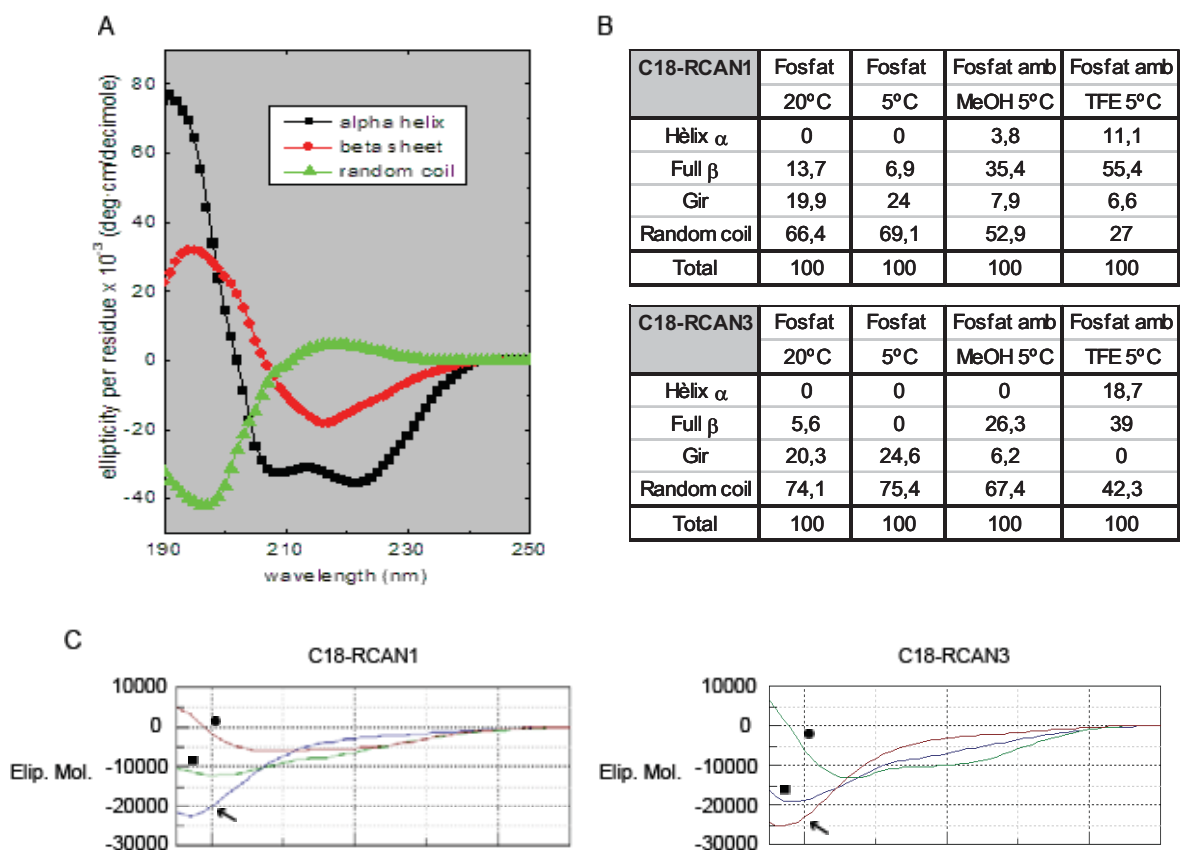
### 3.1. Identificació i caracterització dels pèptids C18 de les RCAN

Per dur a terme els experiments que es descriuran en aquesta tercera part dels Resultats, es va acotar encara més la regió mínima inhibidora de RCAN1-1 i RCAN3-2 dissenyant noves construccions solapants dels respectius motius CIC i determinant la seva capacitat d'inhibir la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina. Aquest treball va ser realitzat per Anna Aubareda. Amb aquesta estratègia el motiu CIC de RCAN1-1 (que comprèn els residus 191-218) i de RCAN3-2 (que comprèn els aminoàcids 178-203), es va reduir a 21 aminoàcids i es va denominar C18. La seqüència d'aquest nou pèptid va ser en RCAN1-1: KYELHAATDTPSVVVHVCEs, i comprèn els aminoàcids 198-218, mentre que en RCAN3-2 la seqüència és: KYELHAGTESTPSVVHVCEs, i comprèn els residus 183-203. El motiu C18 de RCAN1-1 i el C18 de RCAN3-2 són les regions mínimes inhibidores *in vivo* de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT caracteritzades fins al moment. Basant-nos en les seqüències dels motius C18 es van sintetitzar dos pèptids que es van caracteritzar *in vitro* abans de ser emprats en els assaigs d'anisotropia de fluorescència. Aquests dos pèptids s'anomenaran d'aquí en endavant C18-RCAN1 i C18-RCAN3, respectivament.

#### 3.1.1. Anàlisi del plegament *in vitro* dels pèptids C18 de les RCAN per dicroïsm circular

Estudis previs han mostrat que l'exó 7 de RCAN1-1 en solució està molt desestructurat i adopta un plegament tipus *random coil* (Chan et al., 2005). Per determinar si els pèptids C18 de les RCAN, que es troben localitzats dins l'exó 7 de RCAN1-1 i dins l'exó 5 de RCAN3-2 respectivament, també adopten aquest conformació es va realitzar l'anàlisi de les seves estructures secundàries per dicroïsm circular (Figura 22). A l'apartat A s'inclou un esquema dels espectres característics que poden adoptar les proteïnes: en negre es mostra l'espectre d'una hèlix  $\alpha$ , en vermell el d'un full  $\beta$  i en verd una conformació *random coil*.

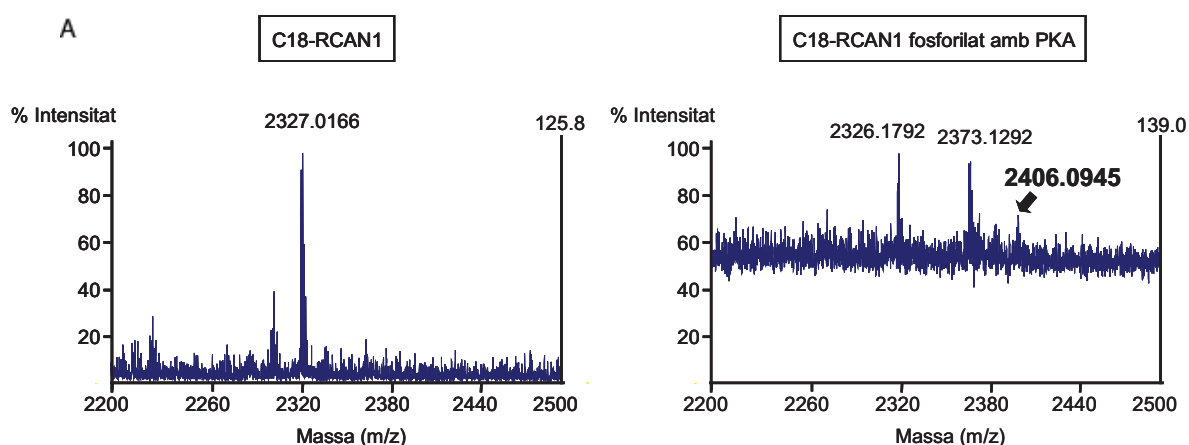
En primer lloc es va determinar l'estructura dels pèptids en tampó fosfat mesurant a diferents temperatures, 20°C i a 5°C (Figura 22B). Els espectres van indicar que el plegament dels pèptids C18 de les RCAN no varia en funció de la temperatura (Figura 22B, comparar les dades obtingudes amb tampó fosfat a 20°C i a 5°C) i que majoritàriament ambdós adopten una estructura *random coil* (Figura 22C, veure gràfiques corresponents de C18-RCAN1 i C18-RCAN3 indicades amb una fletxa). A continuació, es van realitzar assaigs d'inducció de plegament afegint un 50% de metanol o de trifluoroetanol en cada cas (Figura 22C, veure gràfiques indicades amb un quadrat negre o un cercle negre, respectivament). Els dos pèptids canvien lleugerament els espectres en presència de metanol i sobretot de trifluoroetanol, incrementant la component de plegament de tipus full  $\beta$ , de manera més significativa en el cas del pèptid C18-RCAN1 que en el pèptid C18-RCAN3. Els valors calculats pel dicrògraf circular es mostren en detall a la Figura 22B. Aquests resultats mostren que tant el pèptid C18-RCAN1 com el pèptid C18-RCAN3 estan altament desestructurats en solució, però el pèptid C18-RCAN1 presenta una tendència lleugerament major que el pèptid C18-RCAN3 d'adoptar una conformació de full  $\beta$ .

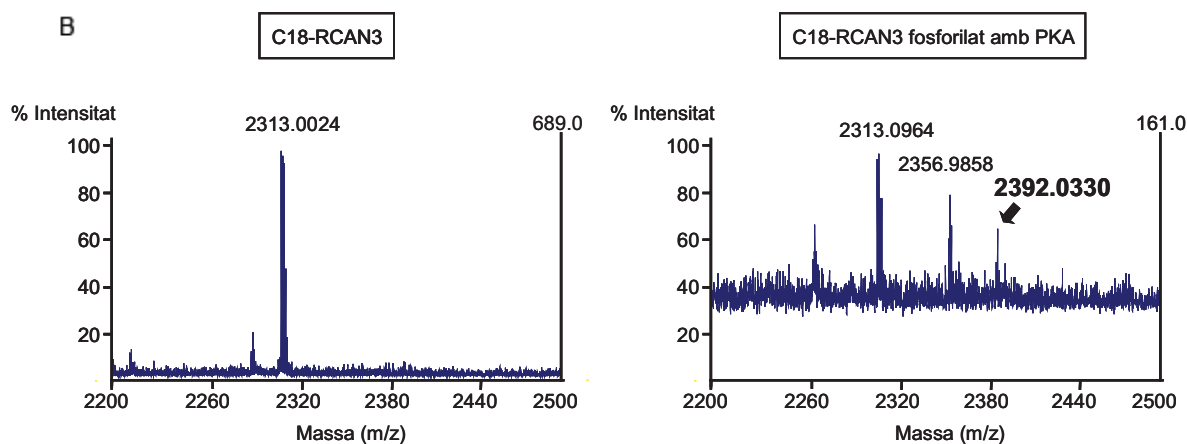


**Figura 22.** A. Esquema que mostra els espectres de diroïsmes circulars característics d'una hèlix  $\alpha$ , d'un full  $\beta$  i d'una estructura *random coil*. B. Taula resum que mostra en detall els valors obtinguts per a cada pèptid en diferents condicions de temperatura i en presència o no d'inductors de plegament. C. Espectres de diroïsmes circulars obtinguts amb els pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3. Tots els espectres mostrats en aquesta gràfica van ser mesurats a 5°C. La fletxa, correspon als pèptids en presència de tampó fosfat. El quadrat, en presència de metanol i el cercle, en presència de trifluoroetanol.

### 3.1.2. Fosforilació *in vitro* dels pèptids C18 de les RCAN

A continuació, es va voler determinar si els pèptids C18 de les RCAN són susceptibles de ser fosforilats *in vitro*. Es van realitzar assaigs *in vitro* de fosforilació emprant la proteïna quinasa A dependent d'AMP<sub>c</sub> (PKA) i posteriorment la massa total es va analitzar per espectrometria de masses (MALDI-TOF) (Figura 23). Ambdós pèptids, en absència de PKA mostren un espectre amb un únic pic corresponent a la massa total de cadascun dels pèptids no fosforilats, C18-RCAN1 i C18-RCAN3, respectivament (Figura 23A i 23B, gràfiques de l'esquerre). En canvi, en presència de PKA, ambdós pèptids mostren uns espectres on apareix un pic amb 80 kDa més de massa molecular que el pèptid no fosforilat, que correspon al pèptid fosforilat (Figura 23A i 23B, gràfiques de la dreta, pic indicat amb una fletxa). Entre el pèptid no fosforilat i el fosforilat va aparèixer una banda que podria correspondre a una modificació provocada per la PKA en el residu de cisteïna present a la seqüència d'ambdós pèptids C18 de les RCAN. El resultat obtingut amb aquests experiments mostren que ambdós pèptids, C18-RCAN1 i C18-RCAN3, són fosforilats *in vitro* per PKA.





**Figura 23.** Espectres de masses obtinguts amb els pèptids C18 de les RCAN fosforilats amb PKA. A. A l'esquerre es mostra l'espectre del pèptid C18-RCAN1 no fosforilat i a la dreta el fosforilat. B. A l'esquerre es mostra l'espectre del pèptid C18-RCAN3 no fosforilat i a la dreta el fosforilat. La fletxa negra indica al nou pic aparegut com a conseqüència de la fosforilació per part de la PKA.

### 3.2. Anàlisi de la interacció C18-RCAN-CnA $\alpha$ mitjançant anisotropia de fluorescència

Un dels Objectius del treball realitzat en aquest treball experimental era identificar noves molècules amb potencial immunosupressor. Per fer això, es va desenvolupar i optimitzar un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció C18-RCAN1-Cn. Prèviament al cribratge de les quimioteques analitzades es va caracteritzar *in vitro* les interaccions dels pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 amb CnA mitjançant anisotropia de fluorescència.

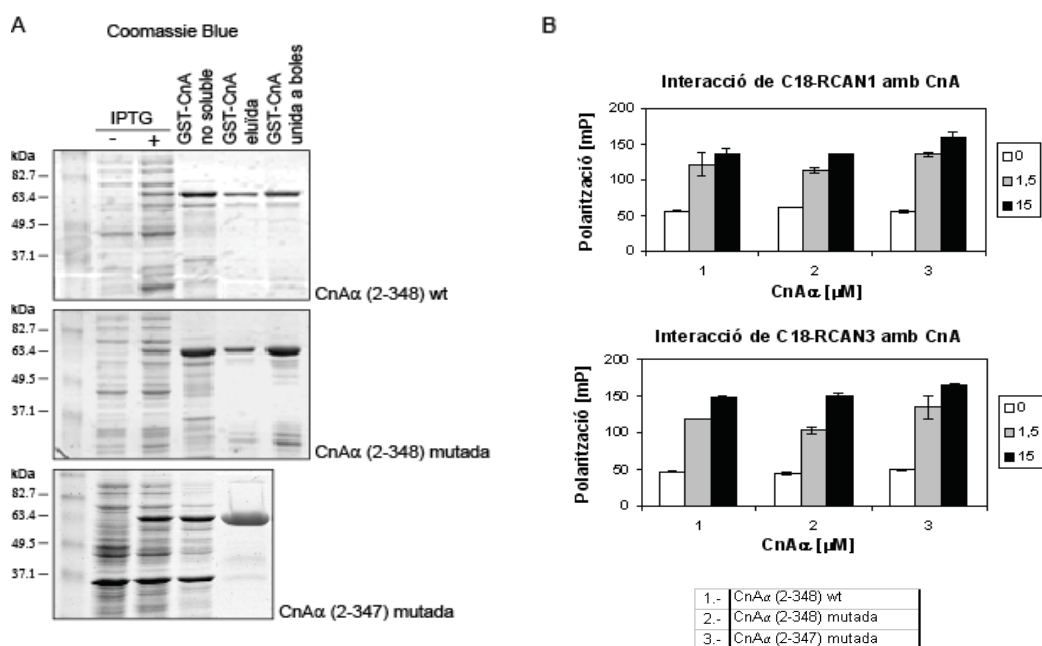
La proteïna emprada en la caracterització *in vitro* d'aquestes interaccions ha estat la CnA $\alpha$  humana. Alguns autors han mostrat que per establir-se la interacció RCAN1-CnA són necessaris els aminoàcids del 21-352 de la CnA $\beta$  (Fuentes et al., 2000) mentre que altres mostren que són necessaris els aminoàcids del 2-342 de la CnA $\alpha$  (Rothermel et al., 2000). En tots dos casos, la CnA utilitzada inclou el domini catalític i una part o tota la regió *linker*, que és la regió situada entre el domini catalític i el domini d'unió a la Calcineurina B (CnB). Al 2004, Roehrl i col. van publicar un article on mostraven la identificació de molècules amb potencial immunosupressor emprant una CnA $\alpha$  que incloïa els aminoàcids 2-347 i que contenia 3 substitucions en la regió del *linker*, Y341S, L343A i M347D, que estableixen la proteïna (Roehrl et al., 2004). Aquesta proteïna va ser utilitzada principalment en els nostres assaigs i l'hem anomenat CnA $\alpha$ (2-347)mutada. A més, per descartar que aquests tres canvis d'aminoàcids poguessin afectar a la interacció amb els pèptids C18 de les RCAN es van realitzar dues construccions més de CnA $\alpha$ : una que comprèn els aminoàcids 2-348 de la CnA $\alpha$  salvatge, anomenada CnA $\alpha$ (2-348)wt, i una altra que també comprèn els residus 2-348 però que conté dues substitucions, Y341S i L343A, a la regió *linker*, anomenada CnA $\alpha$ (2-

348)mutada. Totes les CnA $\alpha$  s'expressen i es solubilitzen correctament, però la CnA $\alpha$ (2-347)mutada és la que s'expressa millor i alhora està menys degradada respecte les altres dues (Figura 24A, comparar els carrils corresponents als eluïts de les tres CnA $\alpha$ ).

La interacció dels pèptids C18 de les RCAN amb les diferents CnA es va analitzar mitjançant el disseny i optimització d'un assaig *in vitro* i la posterior detecció per anisotropia de fluorescència. La descripció de l'assaig i del protocol emprat estan detallats a l'apartat de Materials i Mètodes, Capítol III.

Tot i les petites diferències en la integritat de les tres CnA $\alpha$  la seva capacitat d'interaccionar amb els pèptids C18 de les RCAN és similar (Figura 24B). Les barres en blanc, gris i negre corresponen a les interaccions establertes amb 0  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M i 15  $\mu$ M de CnA $\alpha$ , respectivament. Totes tres CnA $\alpha$  interaccionen de manera dosi-dependent amb els pèptids C18 de les RCAN (Figura 24B, a dalt es mostren les interaccions amb el pèptid C18-RCAN1 i a baix amb el pèptid C18-RCAN3). En les dues concentracions de CnA $\alpha$  assajades, 1.5 i 15  $\mu$ M, la CnA $\alpha$  que sempre va donar lloc a valors lleugerament més alts de polarització va ser la CnA $\alpha$ (2-347)mutada (Figura 24B, comparar les tres CnA $\alpha$  analitzades a la mateixa concentració). Aquests resultats mostren que els pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 interaccionen amb CnA $\alpha$  a través d'alguna regió o regions contingudes dins de la regió que comprèn els aminoàcids 2-347 de la CnA $\alpha$ . A més, les substitucions Y341S, L343A i M347D de la regió *linker* de CnA $\alpha$  no afecten a la interacció d'aquesta amb els pèptids C18 de les RCAN.

Probablement degut a la seva major integritat i rendiment en la seva purificació (Figura 24A), la interacció detectada és major en la CnA $\alpha$ (2-347)mutada que en les altres dues CnA $\alpha$  assajades (Figura 24B). Per això, tots els assaigs que es van realitzar posteriorment van ser fets amb la CnA $\alpha$ (2-347)mutada, que a partir d'ara passarà a anomenar-se només com CnA. Quan s'utilitzin les altres CnA $\alpha$  s'especificarà en el text.



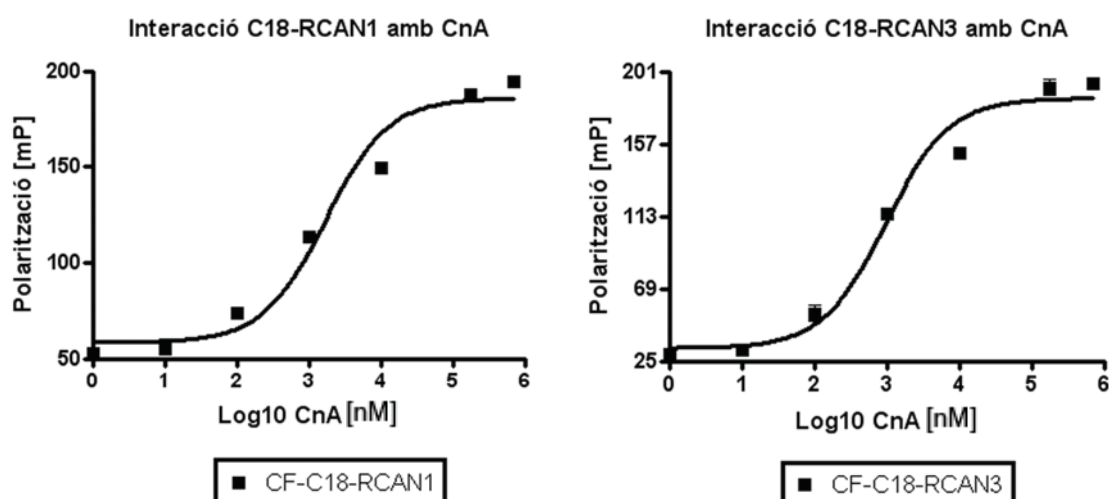
**Figura 24. A.** Expressió i purificació de les tres CnA $\alpha$  assajades: CnA $\alpha$ (2-348)wt, CnA $\alpha$ (2-348)mutada i CnA $\alpha$ (2-347)mutada. **B.** Determinació de la interacció de les tres CnA $\alpha$  amb els pèptids C18-RCAN1, gràfica superior, i C18-RCAN3, gràfica inferior, mitjançant anisotropia de fluorescència.

### 3.3. Caracterització de la interacció *in vitro* dels pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 amb CnA

Un cop posat a punt el mètode de detecció de la interacció dels pèptids C18 de les RCAN i Cn, es va caracteritzar l'afinitat de cadascun dels pèptids per Cn.

#### 3.3.1. Afinitat dels pèptids C18 de les RCAN per CnA

L'afinitat dels pèptids C18 de les RCAN per CnA es va analitzar per anisotropia de fluorescència fixant la concentració de pèptid C18 marcat amb carboxifluoresceïna (CF-C18-RCAN) i incubant-lo en presència de concentracions creixents de CnA (indicades a la figura com el Log10 CnA [nM]) fins arribar a saturar la interacció (Figura 25 a l'esquerra es mostra la interacció del pèptid CF-C18-RCAN1 i CnA i a la dreta la del pèptid CF-C18-RCAN3 i CnA). Per facilitar la comprensió del text, d'aquí en endavant només s'indicarà la presència de la molècula de CF en els pèptids marcats en els quadres de sota de cada gràfica.



**Figura 25.** Corbes de saturació de les dues interaccions analitzades C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA.

Els resultats obtinguts ens van permetre calcular les constants de dissociació ( $K_d$ ) aparents de cadascun dels pèptids que van ser de  $1.25 \pm 0.085 \mu\text{M}$  pel C18-RCAN1 i de  $0.85 \pm 0.05 \mu\text{M}$  pel C18-RCAN3. Ambdós pèptids tenen afinitats similars, tot i que el pèptid C18-

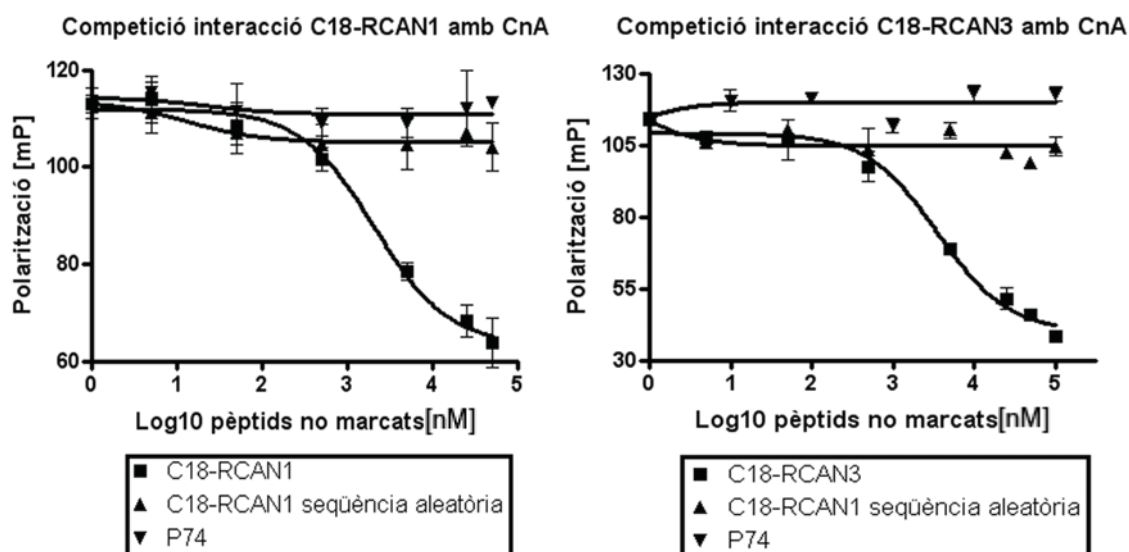


RCAN3 és lleugerament més afí per CnA que el C18-RCAN1. Es considera que les interaccions proteïna-proteïna fisiològiques solen presentar afinitats en el rang de nM- $\mu$ M baix, de tal manera que les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN i Cn estarien dins el rang fisiològic.

### 3.3.2. Especificitat de la interacció dels pèptids C18 de les RCAN per CnA

Per demostrar que les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN i Cn són específiques es van competir aquestes amb concentracions creixents (indicades a la figura com el Log10 pèptids no marcats [nM]) de tres pèptids diferents: el propi pèptid C18 de la RCAN corresponent sense marcar amb carboxifluoresceïna, un pèptid que conté la seqüència del C18-RCAN1 ordenada a l'atzar i un pèptid de seqüència no relacionada (P74) (Figura 26, a l'esquerre es mostra la competició de la interacció C18-RCAN1-CnA i a la dreta la de la interacció C18-RCAN3-CnA).

Cal aclarir que en totes les interaccions analitzades únicament el pèptid que interacciona amb Cn està marcat amb CF, mentre que tots els altres pèptids que competeixen dita interacció no estan marcats amb CF. Per facilitar la comprensió de les figures, al quadre de sota de cada gràfica només s'indicarà el nom d'aquests pèptids però sense especificar que no estan marcats.



**Figura 26.** Competicions de les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA amb els propis pèptids C18 no marcats de cadascuna de les interaccions, un pèptid que conté la seqüència del pèptid C18-RCAN1 ordenada a l'atzar i un altre pèptid de seqüència no relacionada (P74).

Els pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 no marcats desplacen les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA respectivament, de manera dosi-dependent, mentre que els pèptids C18-RCAN1 amb la seqüència ordenada a l'atzar i el P74 no afecten a les interaccions

analitzades (Figura 26). Aquests resultats confirmen que les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA són específiques.

A més, a partir d'aquestes dades es van poder calcular les  $IC_{50}$  de cadascun dels pèptids essent de  $3.7 \pm 0.28 \mu M$  pel C18-RCAN1 i de  $5.9 \pm 0.088 \mu M$  pel C18-RCAN3. Aquests resultats indiquen, que tot i que ambdues interaccions poden ser desplaçades, és lleugerament més difícil de desplaçar la interacció C18-RCAN3-CnA que la interacció C18-RCAN1-CnA.

### 3.3.3. Competició creuada dels pèptids C18 de les RCAN respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA

A continuació es van realitzar competicions d'ambdós pèptids C18 de les RCAN vers les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA, respectivament (Figura 27, a l'esquerra es mostra la competició dels dos pèptids C18 respecte de la interacció C18-RCAN1-CnA i a la dreta respecte de la interacció C18-RCAN3-CnA). En concordança amb les dades mostrades anteriorment que indiquen que el pèptid C18-RCAN3 és lleugerament més afí que el pèptid C18-RCAN1 per CnA, en les dues interaccions estudiades, el pèptid C18-RCAN3 és mostra millor competidor que no pas el C18-RCAN1, tant en la seva pròpia interacció, C18-RCAN3-CnA, com en l'altre, C18-RCAN1-CnA (Figura 27).

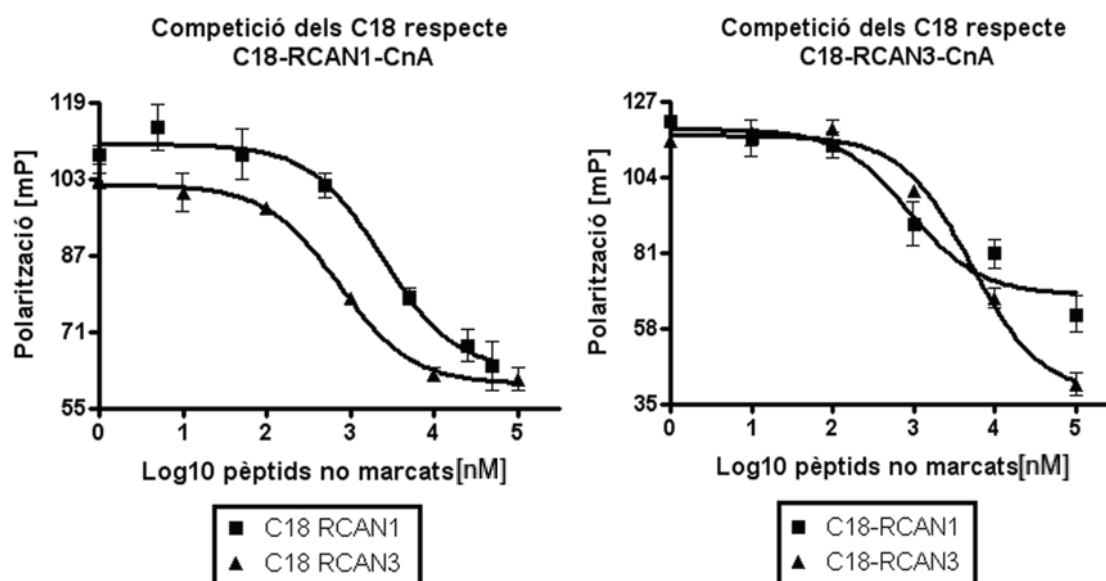


Figura 27. Competicions creuades dels dos pèptids C18 de les RCAN envers les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA, respectivament.

A més, la competició C18-RCAN3-CnA és més difícil de desplaçar que la interacció C18-RCAN1-CnA, tal i com es pot apreciar a partir dels valors de  $IC_{50}$  calculats per a cada pèptid. En la interacció C18-RCAN1-CnA, la  $IC_{50}$  de C18-RCAN1 és de  $3.7 \pm 0.28 \mu M$  mentre que

pel C18-RCAN3 és  $1.5 \pm 0.074 \mu\text{M}$ ; mentre que per la interacció C18-RCAN3-CnA, la  $IC_{50}$  de C18-RCAN1 és  $14.8 \pm 0.75 \mu\text{M}$  mentre que pel C18-RCAN3 és  $5.9 \pm 0.088 \mu\text{M}$ .

### 3.3.4. Competició dels pèptids SPRIEIT i LxVP dels NFAT, que s'uneixen a Cn, respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA

Els factors de transcripció NFAT interaccionen amb CnA i ho fan a través de dos motius, anomenats SPRIEIT (Aramburu et al., 1998), que és considerat com el lloc d'ancoratge dels NFAT en Cn, i el motiu LxVP (Park et al., 2000). En assaigs de competició creuada s'ha determinat que l'un competeix la interacció de l'altre suggerint els autors que les regions de CnA amb les que interaccionen poden ser independents entre sí (Martinez-Martinez et al., 2006).

Amb l'objectiu de saber si els motius SPRIEIT i LxVP dels NFAT interfereixen les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA, es van dur a terme assaigs de competició creuada entre els corresponents pèptids (Figura 28A, gràfiques corresponents a la competició de la interacció C18-RCAN1-CnA i Figura 28B, gràfiques corresponents a la competició de la interacció C18-RCAN3-CnA). Aquests assaigs es van realitzar competint amb quatre pèptids diferents: el propi pèptid C18 corresponent no marcat, el pèptid SPRIEIT, el pèptid LxVP i el pèptid LxVPmut, que correspon a la seqüència del pèptid LxVP ordenada de manera aleatòria i que s'ha demostrat que no interacciona amb CnA (Martinez-Martinez et al., 2006).

En les competicions de les dues interaccions analitzades, els pèptids dels NFATs van mostrar un comportament similar:

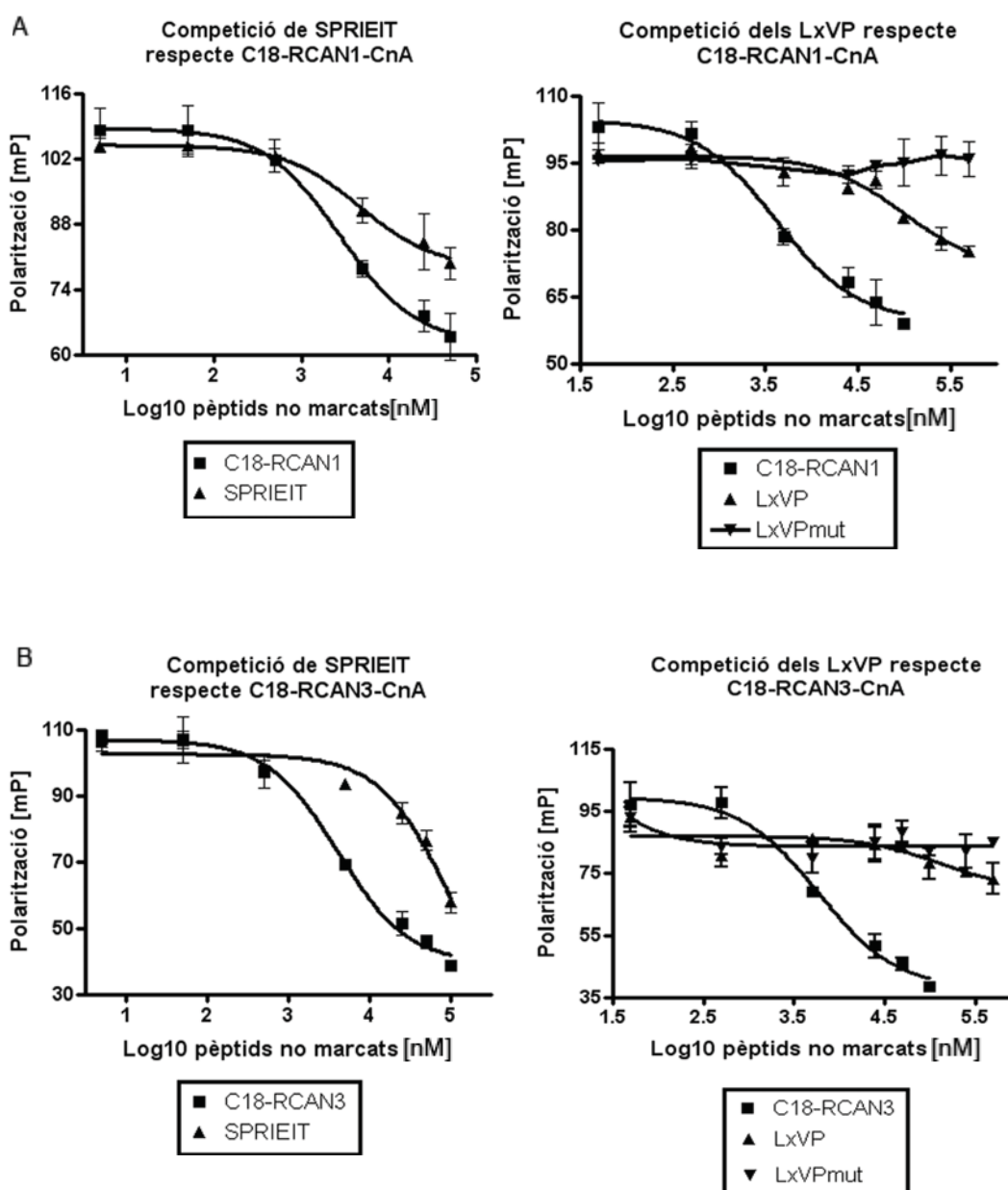
- El pèptid SPRIEIT competeix la interacció dels pèptids C18 de les RCAN amb CnA però de manera menys eficient que els propis pèptids C18 (Figura 28A i 28B, gràfiques de l'esquerre). Les  $IC_{50}$  calculades a partir dels resultats obtinguts són, pel que fa a la interacció C18-RCAN1-CnA,  $3.7 \pm 0.28 \mu\text{M}$  per C18-RCAN1 i  $33 \pm 1.2 \mu\text{M}$  per SPRIEIT mentre que per la interacció C18-RCAN3-CnA, són  $5.9 \pm 0.088 \mu\text{M}$  per C18-RCAN3 i  $56 \pm 0.84 \mu\text{M}$  per SPRIEIT. A més, d'acord amb els resultats mostrats prèviament que suggereixen una major afinitat del pèptid C18-RCAN3 per CnA, la competició observada amb el pèptid SPRIEIT és més eficaç davant la interacció C18-RCAN1-CnA que no pas davant de la interacció C18-RCAN3-CnA. En paral·lel també es va determinar que el pèptid VIVIT, corresponent a la seqüència optimitzada del pèptid natural SPRIEIT, competeix les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN i CnA. A més, aquesta competició també té lloc a l'inrevés, és a dir, que el pèptid C18-RCAN1 inhibeix la interacció VIVIT-CnA (dades no mostrades).

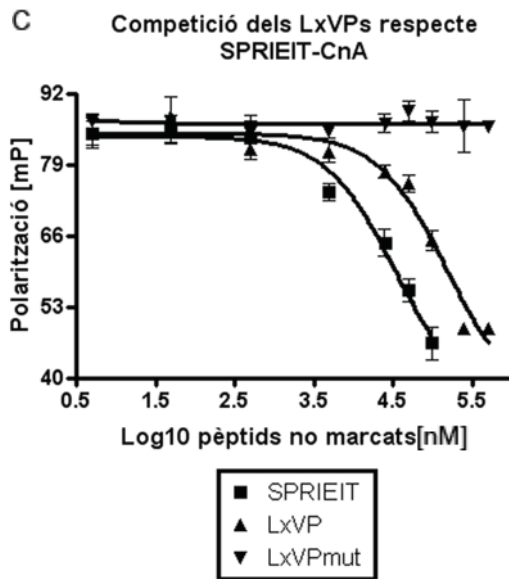
- El pèptid LxVP competeix les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN a concentracions per sobre de  $50 \mu\text{M}$ , i de manera lleugerament més eficaç respecte la interacció C18-RCAN1-CnA, en comparació amb la interacció C18-RCAN3-CnA (Figura 28A i 28B, gràfiques de la dreta, valors de concentracions de pèptids no marcats a partir de  $4.69$  que correspon al  $\text{Log}_{10} [50\mu\text{M}]$ ). Amb els resultats obtinguts es van calcular les  $IC_{50}$  del pèptid LxVP essent de  $100 \pm 4\mu\text{M}$  per la interacció C18-RCAN1-CnA i de  $130 \pm 14\mu\text{M}$  per la interacció

C18-RCAN3-CnA. En canvi, el pèptid LxVPmut no competeix cap de les dues interaccions analitzades.

Com a control d'aquest assaig, es va competir la interacció SPRIEIT-CnA amb els pèptids LxVP i en concordança amb les dades publicades prèviament (Martinez-Martinez et al., 2006), el pèptid LxVP però no el LxVPmut, va competir la interacció SPRIEIT-CnA de manera significativa (Figura 28C). Aquest resultat indiquen que el pèptid LxVP és significativament menys eficient que el pèptid SPRIEIT en competir les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-Cn.

En conjunt, aquestes dades suggereixen que ambdues proteïnes, RCAN i NFAT, s'interfereixen mútuament *in vitro* en la interacció amb CnA.





**Figura 28.** A. Competicions dels pèptids de NFAT respecte la interacció C18-RCAN1-CnA. B. Competicions dels pèptids de NFAT respecte la interacció C18-RCAN3-CnA. C. Competició dels pèptids SPRIEIT, LxVP, LxVPmut respecte la interacció SPRIEIT-CnA. En tots els experiments el pèptid LxVP utilitzat va correspondre a la seqüència del membre NFATc1 (LxVPc1), però per facilitar la comprensió de les figures s'ha anomenat només com LxVP.

### 3.3.5. Competició del pèptid RII i dels complexos fàrmac-immunofilina respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA

Els fàrmacs inhibidors de Cn, CsA i FK506, s'uneixen als receptors intracel·lulars ciclofilina A (CyPA) i FKBP12, respectivament, com a pas previ i indispensable per poder interaccionar amb la Cn i bloquejar l'accés dels substrats de la fosfatasa al seu centre actiu.

Per altra banda, el pèptid RII, que és un fragment de la subunitat reguladora tipus II de la PKA, és un substrat àmpliament conegut de CnA que es considera que s'uneix al centre actiu de la fosfatasa (Enz et al., 1994). De fet, la desfosforilació del pèptid RII per CnA, s'utilitza habitualment com a control positiu en els assaigs *in vitro* de l'activitat fosfatasa de CnA.

Amb l'objectiu de determinar si el pèptid RII i els complexos CsA-CyPA i FK506-FKBP12 interfereixen les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN i Cn, es van realitzar assaigs de competició (Figura 29).

Les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA van ser competides amb concentracions creixents dels complexos CsA-CyPA i FK506-FKBP12, respectivament (Figura 29A, competició del complex CsA-CyPA respecte ambdues interaccions i Figura 29B, competició del complex FK506-FKBP12 respecte ambdues interaccions). En ambdues Figures, en blanc, és mostra el pèptid C18 de les RCAN lliure corresponent a cada interacció. En gris clar es mostra la interacció C18-RCAN-CnA, sense la presència dels complexos competidors, mentre que les diferents intensitats de gris corresponen a les concentracions creixents dels complexos inhibidors. Per últim, en negre es mostra el control positiu de la inhibició de les interaccions C18-RCAN1-Cn i C18-RCAN3-Cn, que correspon al pèptid C18-RCAN1 i C18-RCAN3 no marcat, respectivament, emprat a una concentració equivalent a la seva IC<sub>50</sub>. Els resultats

obtinguts indiquen que, en les nostres condicions experimentals, ni el complex CsA-CyPA ni el FK506-FKB12 competeixen les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN amb CnA.

En paral·lel, es va determinar la capacitat del pèptid RII de desplaçar les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA mitjançant assaigs de competició amb el pèptid RII no marcat (Figura 29C). De manera similar a l'experiment realitzat amb els complexos fàrmac-immunofilina (Figura 29A i 29B), en blanc es mostren els pèptids C18 de les RCAN lliures mentre que en gris s'indica la presència del pèptid RII no marcat a concentracions creixents. L'assaig va incloure un control positiu de la competició, mostrat en gris fosc, que correspon als pèptid C18-RCAN1 i C18-RCAN3 no marcats, respectivament en cada cas, i un control negatiu de la competició, mostrat en negre, que correspon al pèptid C18-RCAN1 amb la seqüència ordenada aleatòriament. Ambdós pèptids control van ser emprats a una concentració equivalent a la seva IC<sub>50</sub>. Els resultats obtinguts mostren que el pèptid RII tampoc competeix cap de les dues interaccions analitzades.

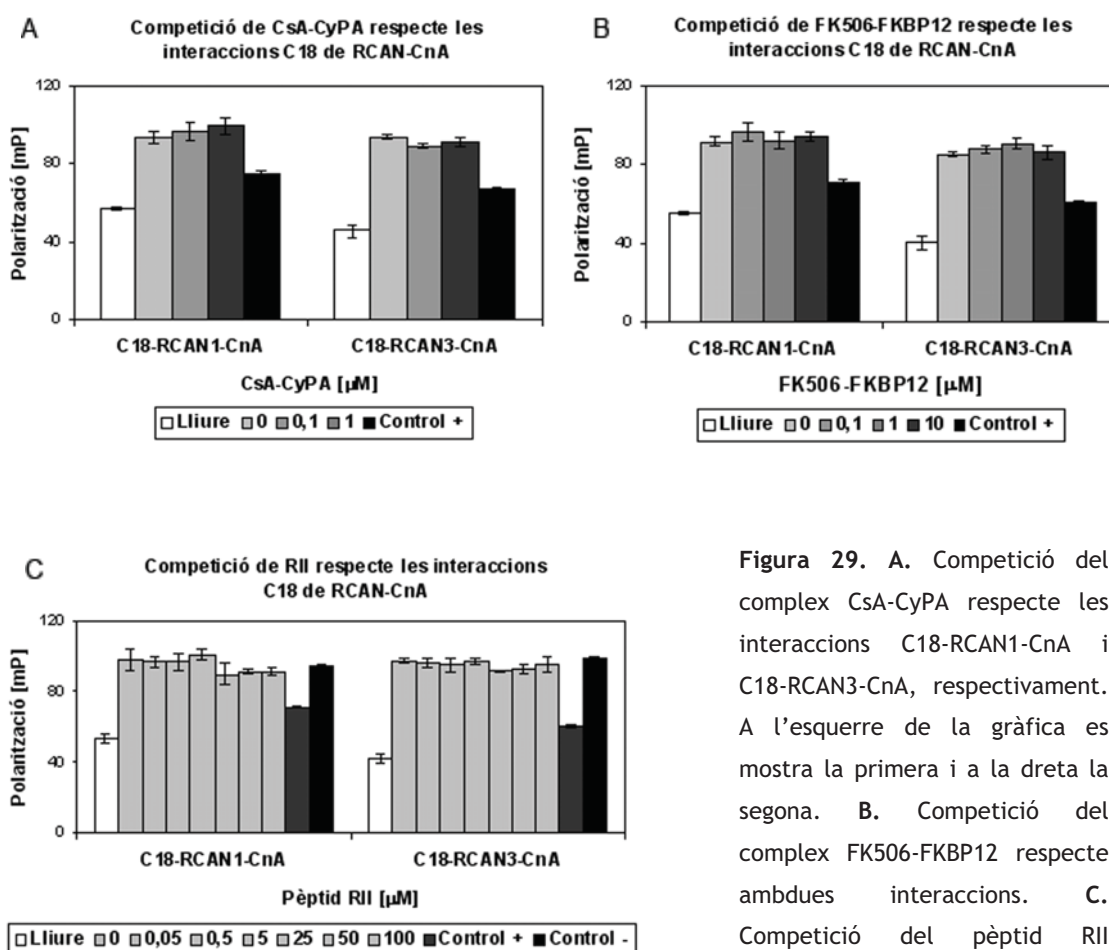


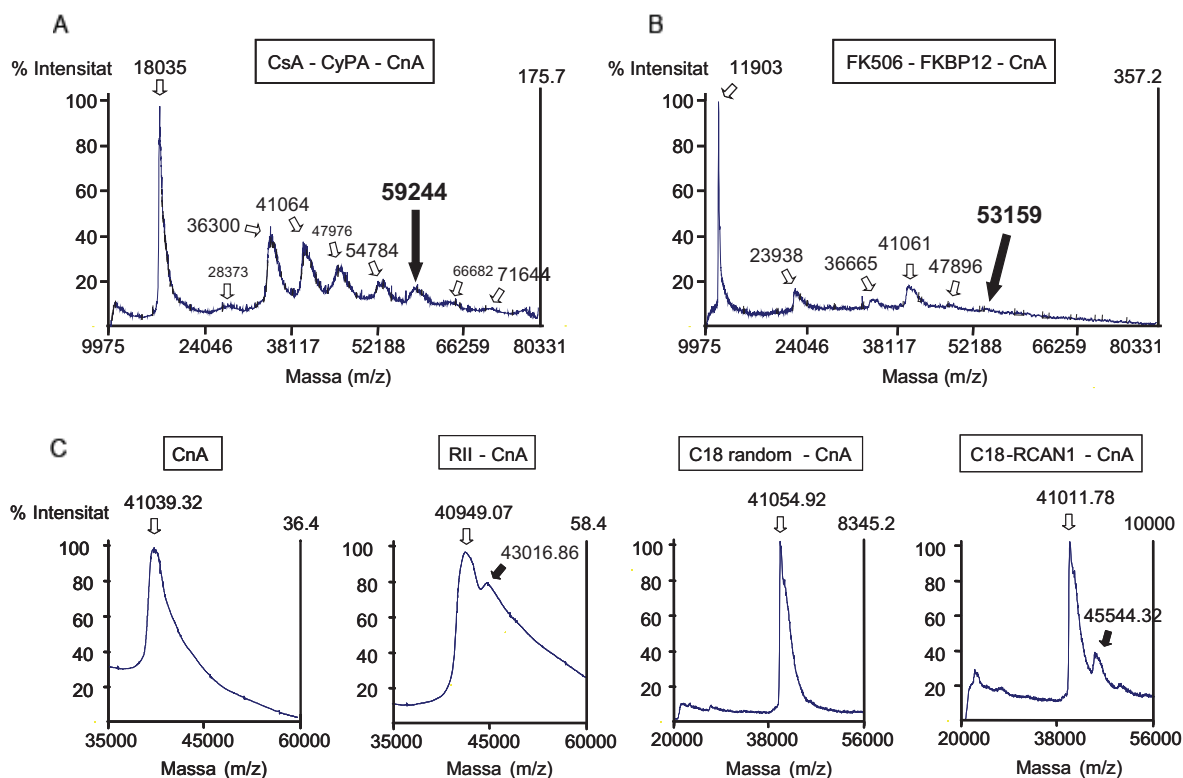
Figura 29. A. Competició del complex CsA-CyPA respecte les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA, respectivament. A l'esquerre de la gràfica es mostra la primera i a la dreta la segona. B. Competició del complex FK506-FKB12 respecte ambdues interaccions. C. Competició del pèptid RII respecte ambdues interaccions.

Com a control dels assaigs mostrats a la Figura 29, es va analitzar si els complexos CsA-CyPA i FK506-FKB12 així com el pèptid RII interaccionen amb la CnA emprada en les

nostres condicions experimentals. Això es va fer mitjançant entrecreuament de les proteïnes amb formaldehid i posterior confirmació de la seva massa total per espectrometria de masses (MALDI-TOF) (Figura 30A i 30B, respectivament). Per establir les diferents interaccions es va afegir 10 cops més de fàrmacs i immunofilines o de pèptid RII, en cada cas. Aquesta és la principal raó per la qual les gràfiques corresponents a les interaccions CsA-CyPA-CnA i FK506-FKBP12-CnA mostren múltiples pics (Figura 30A i 30B, veure gràfiques corresponents). La ciclofilina A emprada té una massa molecular de 18 kDa mentre que la de CsA és de 1.2 kDa. Pel que fa al FKBP12, la seva massa molecular és de 12 kDa mentre que la del FK506 és de 0.82 kDa. Aquestes dades expliquen perquè en l'espectre corresponent al complex CsA-CyPA, apareixen diversos pics amb masses moleculars múltiples de 18 i en el corresponent al complex FK506-FKBP12 apareixen pics múltiples de 12. En el cas de la mostra CsA-CyPA-CnA també van aparèixer alguns pics, indicats en lletra de menor mida, la massa molecular dels quals probablement sigui degut a algun dels components que conté la CyPA comercial emprada. En els dos casos, va aparèixer un pic de 41 kDa que correspon a la CnA sola i un altre, indicat amb una fletxa negra, la massa molecular del qual resulta de sumar la massa molecular de la CnA (41 kDa) més la de la CyPA (18 kDa) i la CsA (1.2 kDa), donant un total de 59 kDa, o la FKBP12 (12 kDa) i la de FK506 (0.82 kDa), donant un total 53 kDa, respectivament (Figura 30A i 30B, respectivament). Aquestes dades indiquen que, en les nostres condicions, els complexos CsA-CyPA-CnA i FK506-FKBP12-CnA s'estableixen, tot i que en el cas de FK506-FKBP12-CnA la intensitat del senyal va ser molt dèbil, la qual cosa fa que en aquest cas, els resultats requereixin ser confirmats. El fet de que aquests complexos no competeixin les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA (Figura 30A) indicaria que no s'estan interferint entre ells alhora d'unir-se a CnA.

En concordança amb les anteriors dades, la interacció RII-CnA també s'estableix per entrecreuament amb formaldehid (Figura 30C). A mode de control d'aquest assaig, es van determinar les interaccions entre el pèptid C18-RCAN1 i el pèptid C18-RCAN1 de seqüència ordenada aleatòriament amb CnA, respectivament. Mentre que la CnA sola dona lloc a un únic pic, la presència del C18-RCAN1 fa que aparegui un nou pic en l'espectre, indicant la interacció del pèptid amb la proteïna. En canvi, en presència del pèptid C18 de seqüència ordenada aleatòriament, la CnA apareix com un únic pic indicant que no hi ha interacció (Figura 30C, veure gràfiques corresponents). A l'igual que passava amb els complexos CsA-CyPA i FK506-FKBP12, el pèptid RII és capaç d'unir-se a la CnA en les nostres condicions però no competeix la interacció dels pèptids C18 de les RCAN amb CnA. Aquestes dades suggereixen que les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA no s'estableixen a prop del lloc d'interacció del pèptid RII i per tant, podrien tenir lloc a través d'alguna regió de CnA localitzada fora del seu centre actiu.





**Figura 30.** A. Interacció del complex CsA-CyPA i CnA analitzada per entrecreuament amb formaldehid i detecció per MALDI-TOF. La fletxa negra indica el pic teòric de la interacció del complex amb CnA. B. Interacció del complex FK506-FKBP12 i CnA. La fletxa negra indica el pic teòric de la interacció del complex amb CnA. C. Interacció de diferents pèptids amb CnA. C18-random, correspon al pèptid C18-RCAN1 de seqüència ordenada a l'atzar. Les fletxes negres indiquen els pics teòrics de la interacció RII-CnA i C18-RCAN1-CnA, respectivament.

### 3.4. Interacció del pèptid PKIIQT de RCAN1 amb CnA

Fins al moment, aquest treball *in vitro* ha estat centrat bàsicament en la caracterització del pèptid C18 perquè és el que té un efecte inhibitor sobre la via de senyalització  $\text{Ca}^{2+}$ -Cn-NFAT. Cal recordar que la proteïna RCAN1 interacciona amb CnA a través de dos motius: el C18 i el PKIIQT. La seqüència del pèptid PKIIQT és la següent: PKPKIIQTRRPEY. Per determinar si ambdós pèptids s'interfereixen en la seva unió amb CnA, a l'igual que passa amb els motius SPRIEIT i LxVP dels NFAT ((Martinez-Martinez et al., 2006) i Figura 28C), vam realitzar assaigs de competició de la interacció C18-RCAN1-CnA amb concentracions creixents de PKIIQT (Figura 31A). A més, en paral·lel també vam analitzar si el pèptid PKIIQT podria competir la interacció *in vitro* SPRIEIT-Cn (Figura 31B), donada la similitud existent entre el motiu consens PxlxxT de les RCAN i el motiu consens PxlxIT dels NFAT, tot i que resultats previs havien mostrat que *in vivo* el motiu PKIIQT és incapaç



d'inhibir la translocació nuclear de NFATc2 (Article 1, Figura 3B). Els resultats obtinguts mostren que el pèptid PKIIQT no competeix ni la interacció C18-RCAN1-Cn ni la interacció SPRIEIT-Cn en les condicions assajades.

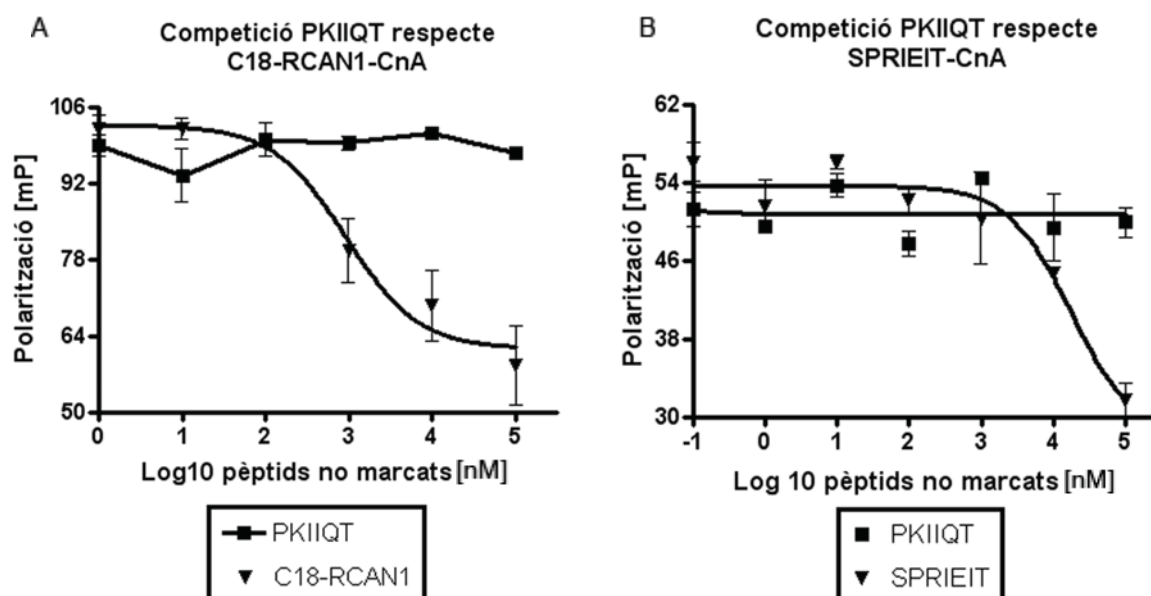
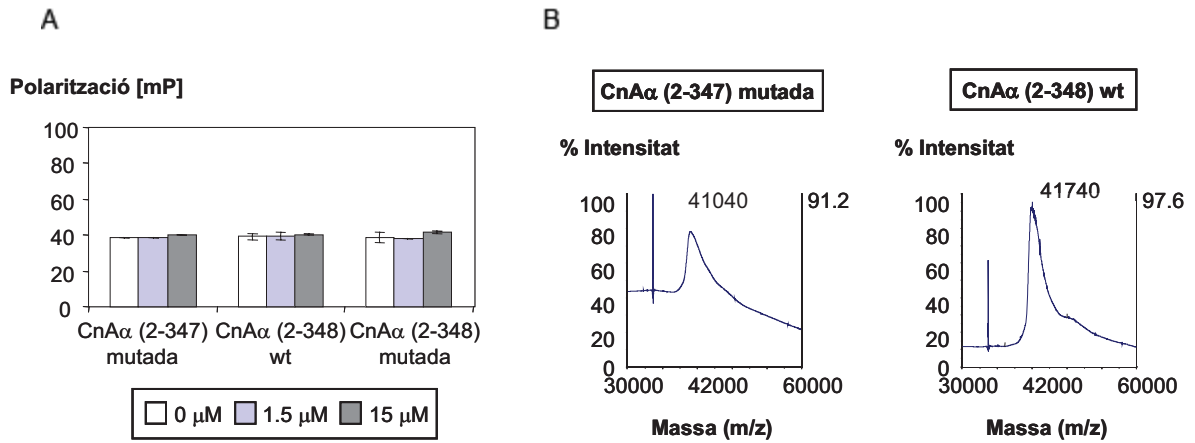


Figura 31. A. Competició del pèptid PKIIQT respecte la interacció C18-RCAN1-CnA. Com a control també es va competir aquesta interacció amb el pèptid C18-RCAN1 no marcat. B. Competició del pèptid PKIIQT respecte la interacció SPRIEIT-Cn. Com a control es va competir aquesta interacció amb el pèptid SPRIEIT no marcat.

Cal dir que els experiments mostrats a la Figura 31 van realitzar-se emprant la Cn $\alpha$ (2-347)mutada que conté tres substitucions a la regió *linker*. A més, publicacions recents havien suggerit que aquesta regió *linker* és essencial perquè Cabin1 i AKAP79, ambdós inhibidors endògens de Cn que inclouen a la seva seqüència motius similars al PxlxIT dels NFAT, puguin interaccionar amb Cn (Rodriguez et al., 2005). Per això, amb la finalitat de descartar que la falta de competició de les interaccions assajades fos deguda a les substitucions presents a la Cn $\alpha$ (2-347)mutada es va realitzar un primer assaig d'interacció entre el PKIIQT marcat amb CF i les tres Cn disponibles: Cn $\alpha$ (2-347)mutada, Cn $\alpha$ (2-348)wt i Cn $\alpha$ (2-348)mutada (Figura 32A). Els resultats obtinguts mostren que el pèptid PKIIQT no interacciona amb cap de les tres Cn emprades. Per confirmar aquest resultat es van realitzar assaigs d'entrecruament amb formaldehid i detecció de la massa total per espectrometria de masses (MALDI-TOF) amb dues de les Cn utilitzades en els assaigs mostrats a la Figura 32A, Cn $\alpha$ (2-347)mutada i Cn $\alpha$ (2-348)wt (Figura 32B). En concordança amb les dades obtingudes prèviament, els espectres mostren un únic pic corresponent a la CnA sola tot i la presència del pèptid PKIIQT de RCAN1.



**Figura 32. A.** Interacció del pèptid PKIIQT amb les tres CnA utilitzades a diferents concentracions. En blanc, es mostra el pèptid CF-PKIIQT lliure, en gris clar el pèptid en presència de CnA (1.5 μM) i en gris fosc, el pèptid en presència de CnA (15 μM) **B.** Espectres de masses corresponents a les interaccions del pèptid PKIIQT amb les CnAα(2-347)mutada, a l'esquerre, i la CnAα(2-348)wt, a la dreta.

Per últim, per descartar que el pèptid PKIIQT *in vitro* requereixi una CnA una mica més gran que les emprades en tots aquests assaigs que només arriben fins a la regió *linker*, es va generar una construcció que contenia una CnA que anava dels aminoàcids 21 al 383. Malauradament, aquesta construcció va ser difícilment expressada i purificada i no va ser capaç ni d'interaccionar amb els pèptids C18 de les RCAN, ni amb els pèptids SPRIEIT i PKIIQT, probablement degut a que la poca proteïna que s'obté no es troba plegada correctament (dades no mostrades). A més, també es va analitzar per entrecreuament amb formaldehid si hi havia interacció entre el pèptid PKIIQT i la Cn bovina de cervell comercial, formada per l'heterodímer de CnA i CnB, per analitzar si calia la totalitat de la CnA (521 aminoàcids) així com la presència de la CnB per interaccionar amb el pèptid PKIIQT. Desafortunadament, els espectres de masses de MALDI-TOF no van ser conclouents donada la baixa intensitat del senyal obtingut (dades no mostrades).

Donat que no s'ha pogut demostrar que el pèptid PKIIQT interacciona amb la CnA emprada, els experiments que fan referència a la competència del pèptid PKIIQT mostrats a la Figura 31, podrien no ser conclouents ja que requeririen la demostració de que aquest pèptid pot interaccionar amb la CnA emprada.

### 3.5. Cerca de molècules amb potencial immunosupressor mitjançant cribratge de quimiotèques respecte la interacció C18-RCAN1-CnA

Amb la finalitat d'identificar noves molècules amb potencial immunosupressor es va desenvolupar un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció C18-

RCAN1-Cn que s'havia caracteritzat prèviament. Aquest assaig es va basar en la interacció C18-RCAN1-CnA, enlloc de amb la de C18-RCAN3-CnA, perquè el pèptid C18-RCAN3 sembla ser lleugerament més afí per CnA que el pèptid C18-RCAN1, la qual cosa indica que la interacció C18-RCAN3-CnA podria ser més difícil de desplaçar que la de C18-RCAN1-CnA.

En l'actualitat hi ha disponibles diversos tipus de col·leccions de molècules o quimiotèques, que s'utilitzen per cercar noves molècules amb potencial terapèutic. Aquestes quimiotèques poden estar formades per composts sols, amb una única molècula per cada tub assajat, o per mesclades controlades de composts, amb diverses molècules presents per cada tub assajat. En aquest treball experimental s'han emprat els dos tipus de format.

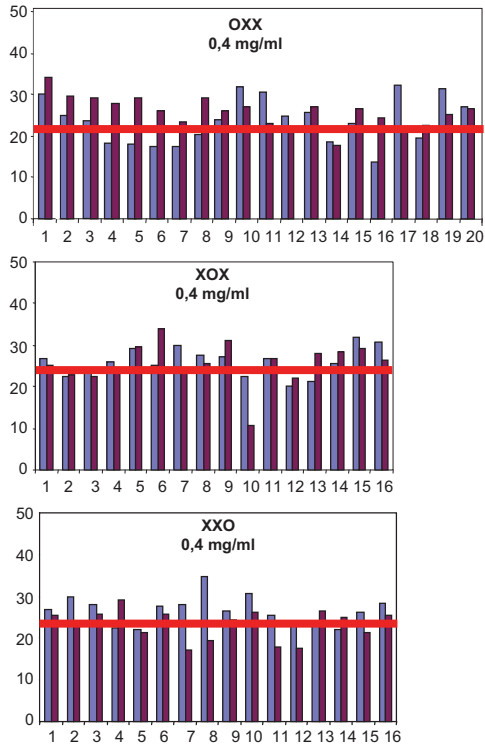
### 3.5.1. Cribratge de quimiotèques de mesclades controlades de peptoides

Donat que l'anàlisi de l'estructura del pèptid C18-RCAN1 per dicromisme circular va mostrar que en solució adopta una conformació *random coil* (Figura 22), el primer tipus de quimioteca que es va analitzar va ser una quimioteca de peptoides. Els peptoides són uns peptidomimètics formats per *N*-alquilglicines caracteritzats entre d'altres coses per mostrar gran flexibilitat estructural. En el nostre cas vam provar dues quimiotèques de peptoides, una formada per trímers i una altra per pentàmers, essent en ambdós casos quimiotèques de mesclades controlades en format de rastreig posicional. Aquests tipus de quimiotèques permeten cribar moltes molècules en poc temps donat que s'analitzen mesclades de composts enlloc de composts sols. A partir dels resultats obtinguts i mitjançant un procés de deconvolució es fixen les posicions més actives en cada cas i es sintetitzen peptoides individuals de seqüència definida que hauran de tornar a ser assajats.

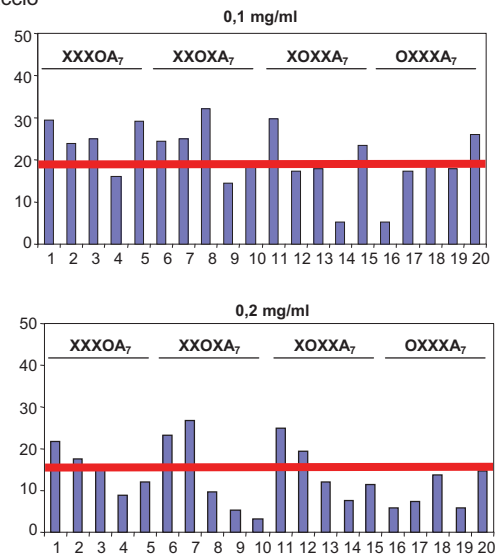
La primera quimioteca analitzada va ser la dels trímers que conté 5.120 peptoides diferents amb una massa molecular mitjana de 500 Da (Figura 33A). Aquesta quimioteca va ser assajada a diferents concentracions des de 0.1 mg/ml fins a 2 mg/ml, obtenint-se resultats similars, tot i que a la figura només es mostren els resultats de l'assaig a 0.4 mg/ml. El soroll de fons de l'assaig s'indica a la figura amb una línia vermella. Cap de les mesclades analitzades va desplaçar la interacció de manera significativa.

A continuació es va analitzar una altra quimioteca de peptoides però formada per pentàmers enlloc de per trímers, per descartar que els trímers fossin massa petits com per desplaçar la interacció C18-RCAN1-CnA. La massa molecular mitjana dels pentàmers emprats va ser de 850 Da (Figura 33B). La quimioteca conté en total 625 peptoides i la cinquena posició està fixada (amb una determinada amina anomenada A<sub>7</sub>) en tots els peptoides, de tal manera que únicament les altres 4 posicions poden variar. Aquesta quimioteca es va assajar a 0.1 i 0.2 mg/ml obtenint-se resultats similars. A la Figura 33B només es mostren els corresponents a l'assaig fet a 0.1 mg/ml. Cap de les mesclades analitzades va desplaçar significativament la interacció C18-RCAN1-CnA.

A

% Desplaçament  
interacció

B

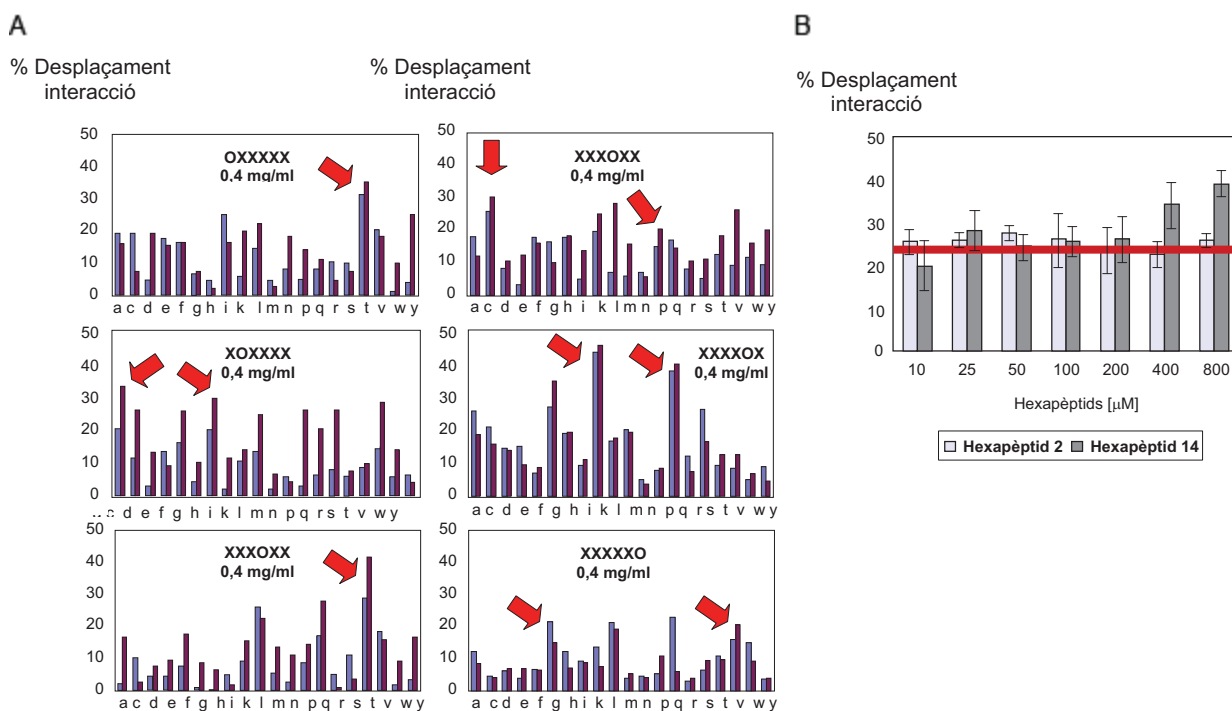
% Desplaçament  
interacció

**Figura 33.** A. Cribratge d'una quimioteca de peptoides formada per mesclades controlades de trímers en format de rastreig posicional. O, correspon a la posició fixada per una determinada amina en els peptoides analitzats, mentre que X, correspon a les posicions variables B. Cribratge d'una quimioteca de peptoides formada per mesclades controlades de pentàmers. Aquests peptoides tenien la posició número 5 fixada amb una amina, anomenada A<sub>7</sub>. El soroll de fons de l'assaig s'indica a la figura amb una línia vermella.

### 3.5.2. Cribratge d'una quimioteca de mesclades controlades d'hexapèptids de D-aminoàcids

A continuació, es va cribrar una quimioteca de mesclades controlades en format de rastreig posicional formada per gairebé  $2.5 \times 10^6$  milions d'hexapèptids de D-aminoàcids. Els pèptids formats per D-aminoàcids enlloc de pels L-aminoàcids naturals són menys susceptibles a proteòlisi per part de les proteases intracel·lulars. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 34A. A diferència dels resultats obtinguts amb les quimiotèques de peptoides, els desplaçaments promoguts pels hexapèptids de D-aminoàcids en algunes posicions van arribar a valors de desplaçament del 30-45% (Figura 34A). En base a aquests resultats es va procedir a deconvolucionar les dades obtingudes i a sintetitzar 16 pèptids de seqüència definida (Veure

seqüència a Materials i Mètodes, Capítol III). Aquests pèptids tenien fixades cada posició amb l'aminoàcid o aminoàcids que promouen un major desplaçament de la interacció (Figura 34A, les posicions fixades estan indicades amb una fletxa vermella). Els 16 pèptids es van assajar a 200  $\mu\text{M}$  i a partir dels resultats obtinguts, els pèptids es van poder classificar en dos grups: els que desplaçaven la interacció menys d'un 30% i els que la desplaçaven més d'un 30%. Del primer grup es va escollir el pèptid número 2 i del segon el pèptid número 14, que havia promogut vora el 40% de desplaçament de la interacció, i es va fer un assaig de dosi-resposta per determinar si aquest desplaçament era específic (Figura 34B). Els resultats mostren que el pèptid número 2 provoca un desplaçament al voltant del 20% en totes les concentracions analitzades. En canvi, el pèptid 14 disrupta la interacció C18-RCAN1-CnA de manera específica, donat que el seu comportament és dosi-dependent, arribant a desplaçar la interacció un 40%. En un futur, està previst realitzar assaigs funcionals amb el pèptid 14 per avaluar el seu potencial efecte inhibidor sobre la via de senyalització  $\text{Ca}^{2+}$ -Cn-NFAT *in vivo*.



**Figura 34.** A. Cribratge d'una quimioteca de mesclades controlades d'hexapèptids de D-aminoàcids en format de rastreig posicional. B. Assaig dosi-resposta dels hexapèptids de D-aminoàcids definits número 2 i número 14 respecte la interacció C18-RCAN1-CnA.

### 3.5.3. Cribratge de quimiotèques de composts sols

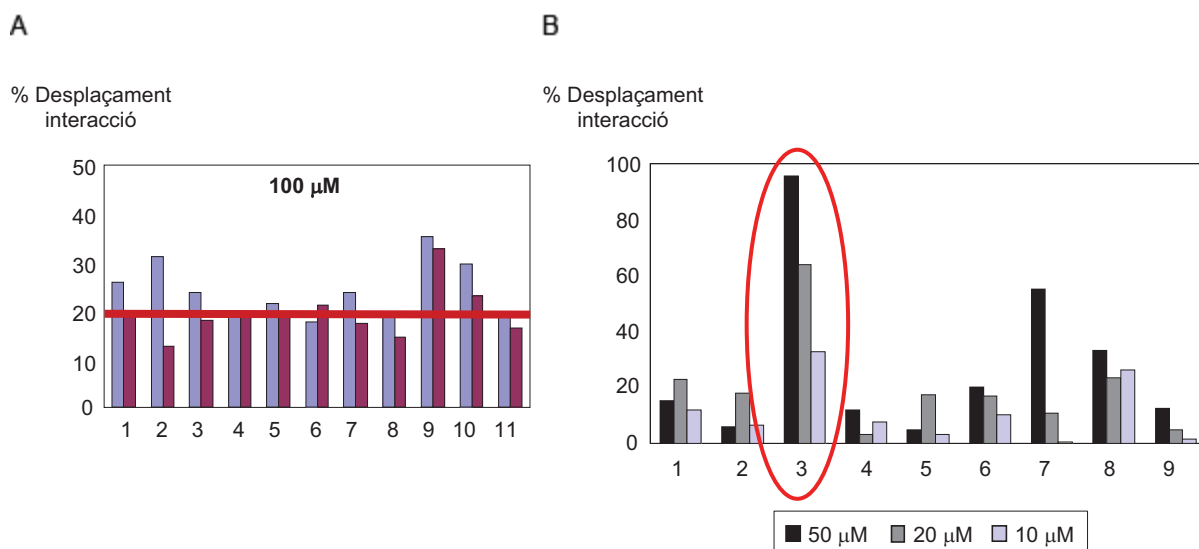
Amb la finalitat d'identificar més *hits* candidats es va realitzar el cribratge de dues quimiotèques formades per composts sols. Una era una petita col·lecció formada per 11 productes que eren sals de tetraalquilamoní amb una càrrega positiva i amb una massa molecular de 450 Da. L'altra va ser una quimioteca de 237 molècules petites de naturalesa

diversa i que tenien un rang ampli de massa molecular que anava des de 100 a 900 Da (Figura 35). En ambdós casos els productes van ser assajats a 100  $\mu\text{M}$ .

Pel que fa a la col·lecció d'onze productes, el producte número 9 va desplaçar la interacció un 35% (Figura 35A). Resta pendent realitzar un assaig de dosi-resposta, per determinar l'especificitat del desplaçament que provoca i posteriorment assaigs funcionals *in vivo*.

Pel que fa a la col·lecció de 237 productes, es va realitzar una primera selecció d'aquelles molècules que van desplaçar la interacció C18-RCAN1-CnA més d'un 45%, i amb elles, es va realitzar un assaig de dosi-resposta a 10, 20 i 50  $\mu\text{M}$ . Dels 9 productes analitzats, el número 3 va ser el que va donar lloc a un desplaçament major, arribant a ser gairebé total a 50  $\mu\text{M}$  (Figura 35B). D'aquí en endavant aquest producte passarà a anomenar-se IDI3A.

En tots els cribratges de molècules realitzats en aquest treball experimental sempre s'han incubat els potencials disruptors amb la CnA durant 15 minuts prèviament a afegir qualsevol dels pèptids marcats amb carboxifluoresceïna. Aquesta estratègia, habitualment emprada dins el camp, s'utilitza per facilitar la identificació de molècules que desplacin de manera poc afí la interacció analitzada i d'aquesta manera incrementar el número de *hits* identificats. Aquesta va ser la manera com es va identificar el producte IDI3A. Per acabar de confirmar els resultats obtinguts, es va tornar a realitzar l'assaig dosi resposta mostrat a la Figura 35B però invertint l'ordre, és a dir, incubant inicialment el pèptid CF-C18-RCAN1 amb CnA durant 15 minuts i després afegint el producte IDI3A (dades no mostrades). Els resultats obtinguts invertint l'ordre van ser similars als obtinguts inicialment suggerint que el producte IDI3A és igualment eficaç en desplaçar la interacció analitzada.

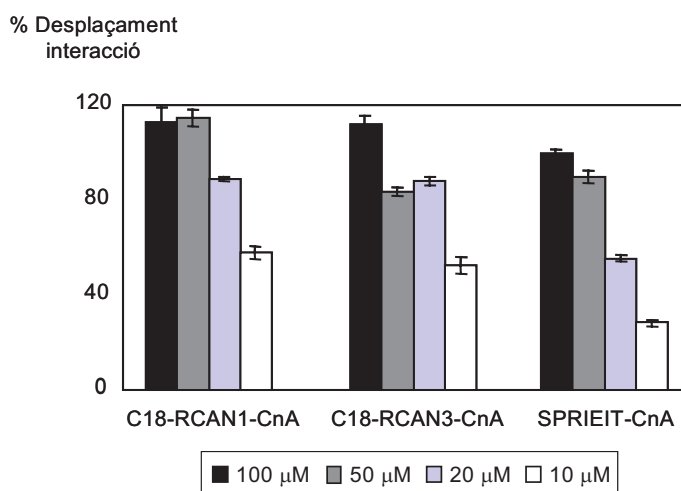


**Figura 35.** A. Cribratge de la quimioteca de composts sols formada per sals de tertraalquilamoni amb càrrega positiva. B. Assaig dosi-resposta dels productes de la quimioteca de composts sols formada per molècules petites que van produir més d'un

45% de desplaçament de la interacció C18-RCAN1-CnA. El producte IDI3A es troba ressaltat amb un cercle vermell.

### 3.5.4. Competició *in vitro* del producte IDI3A respecte altres interaccions amb potencial immunosupressor

Amb la finalitat de determinar si el producte IDI3A també pot interferir altres interaccions, vam realitzar assaig dosi-resposta mitjançant anisotropia de fluorescència respecte les unions C18-RCAN3-CnA i SPRIEIT-CnA (Figura 36). En tots els casos el producte IDI3A desplaça específicament les interaccions analitzades.



**Figura 36.** Desplaçament dosi-depenent de les interaccions C18-RCAN1-Cn, C18-RCAN3-Cn i SPRIEIT-Cn en presència de concentracions decreixents de producte IDI3A.

### 3.5.5. Caracterització de l'efecte funcional del producte IDI3A

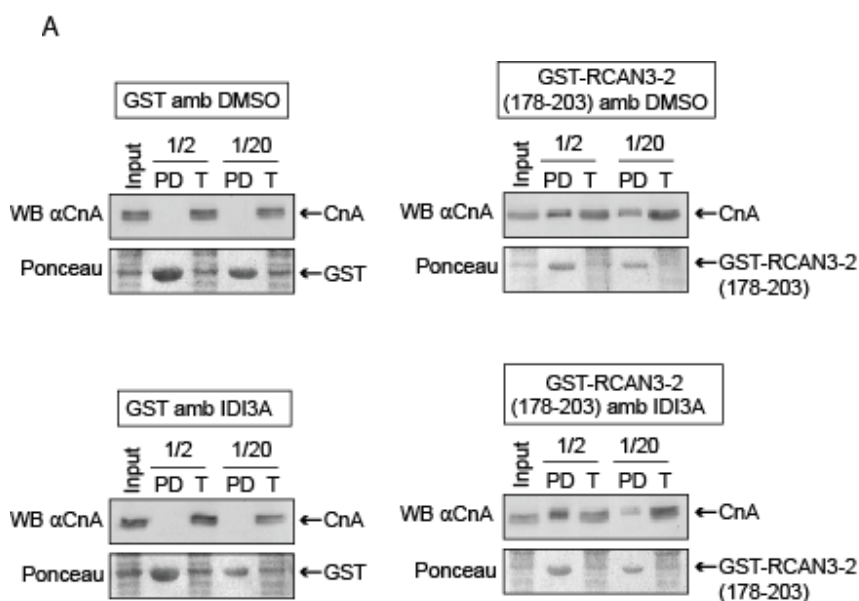
La identificació de *hits in vitro* requereix la confirmació dels resultats obtinguts emprant diferents metodologies *in vivo*. Pel que fa al producte IDI3A es va fer mitjançant tres aproximacions:

- Avaluació de la capacitat del producte IDI3A de competir la interacció RCAN-CnA mitjançant assaigs de tipus *pull down*.
- Estudi de la capacitat d'inhibició del producte IDI3A vers la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina.
- Anàlisi del nivell d'expressió gènica de diverses citocines dependents de NFAT en presència del producte IDI3A.

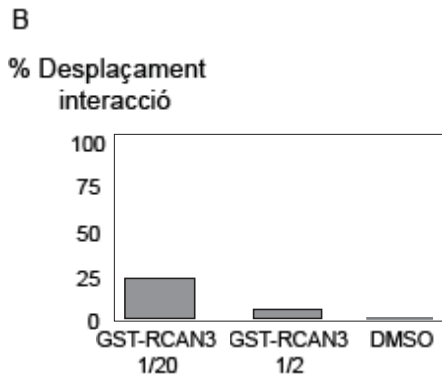
### 3.5.5.1. Avaluació de la capacitat del producte IDI3A de competir la interacció RCAN-CnA mitjançant assaigs de tipus *pull down*

Amb la finalitat de reproduir *in vivo* la competició identificada *in vitro* es van realitzar assaigs *pull down* per determinar la interacció entre la CnA endògena de Jurkat i la construcció GST-RCAN3-2(178-203), que inclou el pèptid C18 de RCAN3 (Figura 37).

Els assaigs es van fer en presència de DMSO, que és el vehicle del producte, o amb el producte IDI3A emprant 1 mg de proteïna total de Jurkat com a font endògena de CnA. Es van utilitzar tres concentracions diferents de GST-RCAN3-2(178-203), considerades com a 1, 1/2 i 1/20 (Veure en detall el protocol emprat per fer el *pull down*, Materials i mètodes, Capítol II), donat que sabem per les corbes de saturació que C18-RCAN3 és moderadament afí per CnA. A la Figura 37, només es mostren les dades corresponents a les concentracions 1/2 i 1/20. Com a control negatiu d'interacció de l'assaig es va emprar la proteïna GST sola. La proteïna GST no interacciona amb CnA en cap de les dues concentracions analitzades ni en presència de DMSO ni de producte IDI3A (Figura 37A, imatges superior i inferior del costat esquerre, veure la proteïna GST en els carrils PD, per *pull down*, mentre que la CnA està en els carrils T, per través). En canvi, la proteïna de fusió GST-RCAN3-2(178-203) interacciona amb CnA a les dues concentracions considerades, però menys quan la interacció es determina en presència del producte IDI3A (Figura 37B, imatges superior i inferior del costat dret, comparar la intensitat de la banda de CnA en els carrils PD en les cèl·lules tractades amb DMSO respecte les tractades amb el producte IDI3A). Aquestes bandes van ser quantificades i referides a la quantitat de proteïna GST o GST-RCAN3-2(178-203) presents en els carrils PD i els valors calculats es mostren a la Figura 37B. Els resultats obtinguts indiquen que el producte IDI3A es mostra més eficaç competint la interacció GST-RCAN3-2(178-203)-Cn en presència de concentracions baixes de proteïna GST-RCAN3-2(178-203). A més, aquestes dades mostren que el producte IDI3A és capaç de promoure un desplaçament *in vivo* d'un 20-30% de la interacció RCAN3-2-Cn.





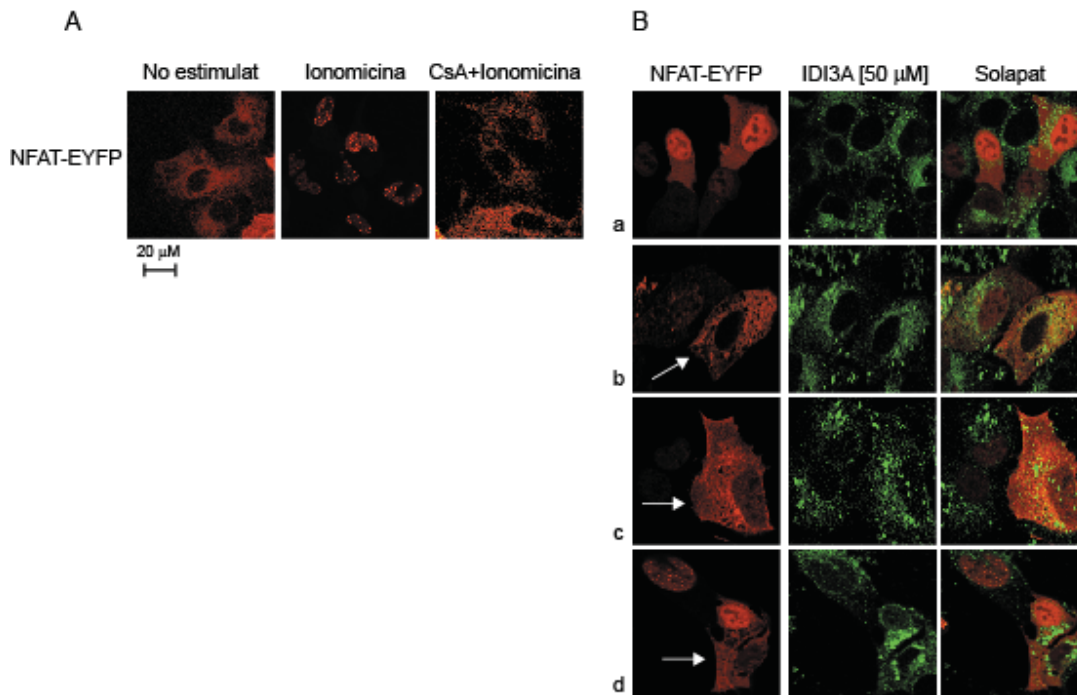


**Figura 37. A.** Competició *in vivo* de la interacció GST-RCAN3-2-(178-203)-CnA en presència del producte IDI3A a 100  $\mu\text{M}$ . **B.** Representació gràfica del percentatge de desplaçament de la interacció promogut en presència del producte IDI3A a 100  $\mu\text{M}$  davant quantitats diferents de proteïna GST-RCAN3-2(178-203). PD, significa *pull down*. T, significa través.

### 3.5.5.2. Estudi de la capacitat d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules estimulades amb ionomicina

Amb la finalitat d'analitzar si el producte IDI3A té una funció inhibidora sobre la via de senyalització Cn-NFAT, es va determinar la seva capacitat d'inhibir la translocació nuclear de NFAT en cèl·lules transfectades amb NFAT-EYFP i estimulades amb ionomicina (Figura 38). Donat que el producte IDI3A és fluorescent es va poder determinar la seva entrada a les cèl·lules U-2 OS quan s'utilitzaven concentracions superiors a 20  $\mu\text{M}$ . En altres tipus cel·lulars el percentatge d'incorporació del producte IDI3A va ser diferent (dades no mostrades).

A mode de control, les cèl·lules U-2 OS no estimulades mostren NFAT-EYFP al citoplasma (Figura 38A). Quan s'estimulen amb ionomicina, es produeix un increment en la concentració intracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$ , i es promou la translocació completa de NFAT-EYFP a nucli presentant el patró característic en forma de *speckles*. Aquesta translocació nuclear no té lloc quan les cèl·lules són tractades prèviament a la estimulació amb un inhibidor de la Cn, com és la CsA. Aquest assaig es va realitzar en presència de diferents concentracions de producte IDI3A, de 0.1 a 50  $\mu\text{M}$ , però a la Figura 38 només es mostren les imatges corresponents a les cèl·lules U-2 OS tractades amb una concentració final de 50  $\mu\text{M}$  i estimulades posteriorment amb ionomicina. El patró general observat en les preparacions va ser el corresponent a la primera fila de fotografies de la Figura 38B identificada amb la lletra "a": NFAT-EYFP localitza parcialment a nucli i parcialment en el citoplasma i el patró de *speckles* que s'observa en el control tractat amb ionomicina passa a ser un patró nuclear difús en presència del producte IDI3A. A més, en un 25% del total de cèl·lules transfectades, NFAT-EYFP apareix totalment retingut al citoplasma (Figura 38B, línies de fotografies "b", "c" i "d", cèl·lules indicades amb una fletxa blanca). Aquests resultats mostren que el producte IDI3A inhibeix la translocació nuclear de NFAT *in vivo*.

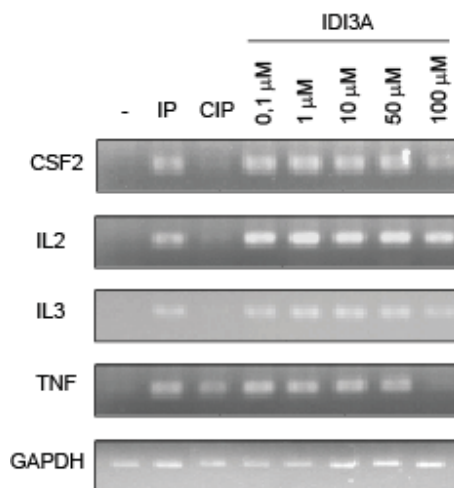


**Figura 38.** Inhibició de la translocació de NFAT-EYFP en cèl·lules U-2 OS tractades amb el producte IDI3A **A.** Control de l'assaig en absència d'estímul, en presència de ionomicina o en presència de CsA+ionomicina. **B.** Localització cel·lular de EYFP-NFAT en presència del producte IDI3A. Les quatre files indicades com "a", "b", "c" i "d" corresponen a cèl·lules estimulades amb ionomicina en presència de 50 µM de producte IDI3A. En vermell es mostra la proteïna EYFP-NFAT i en verd el producte IDI3A. Les fletxes blanques mostren cèl·lules amb NFAT-EYFP retintut totalment al citoplasma.

### 3.5.5.3. Anàlisi del nivell d'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT en presència del producte IDI3A

Per confirmar si aquest efecte inhibitor del producte IDI3A respecte la translocació de NFAT té conseqüències envers la transcripció de gens dependents de NFAT, es va analitzar el nivell d'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT en cèl·lules Jurkat (Figura 39). Les cèl·lules van ser tractades amb concentracions creixents del producte IDI3A (des de 0.1 a 100 µM) i posteriorment estimulades amb ionomicina+PMA. A mode de control, les cèl·lules Jurkat no van ser estimulades o van ser tractades amb CsA prèviament a l'estimulació. Com ja s'ha comentat anteriorment, el producte IDI3A està dissolt en DMSO, així que per descartar possibles interferències provocades pel vehicle, es va igualar la quantitat de DMSO en tots els punts. Com a control de l'assaig es va determinar el nivell d'expressió de *GAPDH*. Totes les citoquines analitzades *CSF2*, *IL2*, *IL3* i *TNF* mostren que la seva expressió es dependent de  $Ca^{2+}$  i mediada per Cn (Figura 39, comparar els carrils (-), IP i

CIP, respectivament). La presència del producte IDI3A a 100  $\mu\text{M}$  promou que el nivell d'expressió de *CSF2*, *IL3* i *TNF* disminueixi, mentre que el de *IL2*, no (Figura 39, veure el carril corresponent a 100  $\mu\text{M}$  en totes les citoquines analitzades). Els resultats obtinguts indiquen que el producte IDI3A disminueix el nivell d'expressió de diverses citoquines dependents de NFAT, de forma més destacada la de *TNF*, de manera dosi dependent.



**Figura 39.** Anàlisi de l'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT en presència de concentracions creixents de producte IDI3A. A mode de control, les cèl·lules van ser no estimulades (-), estimulades amb ionomicina i PMA (IP) o inhibides amb CsA prèviament a l'estimulació amb IP (CIP).

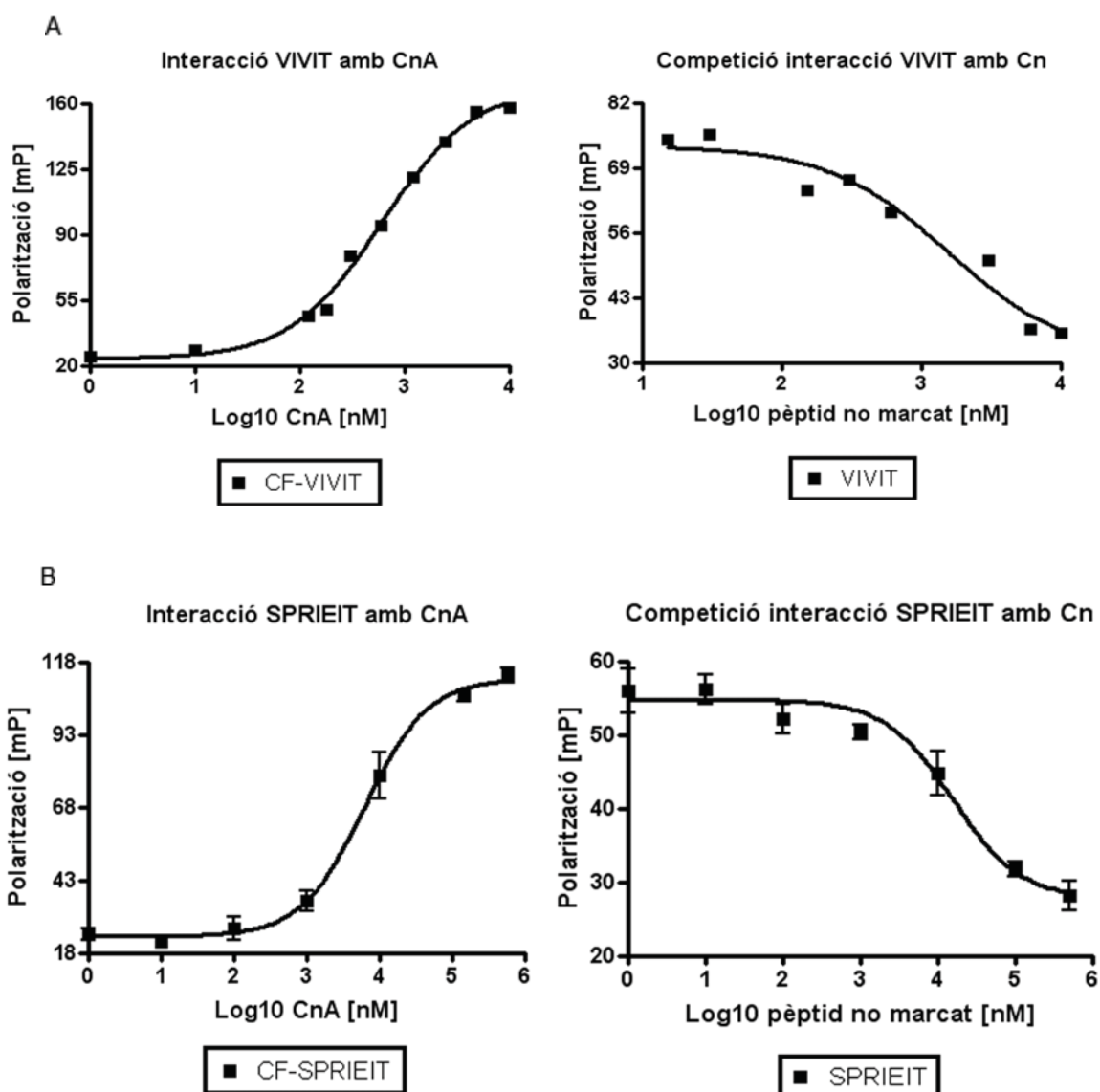
### 3.6. Caracterització de la interacció *in vitro* de CnA amb el pèptid VIVIT de NFAT

El pèptid VIVIT és un pèptid que interacciona amb Cn amb una alta afinitat i que va ser seleccionat a partir de quimiotèques combinatòries de pèptids en base al motiu anomenat SPRIET d'anclatge dels NFATs a Cn (Aramburu et al., 1999). Aquest pèptid inhibeix la via de senyalització de NFAT però no l'activitat fosfatasa de Cn, la qual cosa el fa interessant perquè pot ser una eina per buscar molècules immunosupressores que siguin més específiques que els inhibidors de Cn actuals, CsA i FK506. En aquest sentit, al 2004, Roehrl i col. (Roehrl et al., 2004) van publicar un article en el que identificaven i caracteritzaven uns composts anomenats INCAs (per *inhibitors of NFAT-calcineurin association*) capaços de desplaçar la interacció VIVIT-CnA *in vitro* a partir d'una quimioteca de 16.320 composts orgànics petits mitjançant anisotropia de fluorescència. Arrel d'aquests resultats, es va decidir seguir una estratègia similar a la del grup del Dr. Patrick Hogan però en el nostre cas amb la interacció C18-RCAN1-CnA (Resultats mostrats anteriorment).

La primera interacció que vam posar a punt va ser la de VIVIT-CnA i els resultats obtinguts sota les nostres condicions experimentals van ser similars als publicats anteriorment. A continuació i donat que disposàvem de diverses quimiotèques, vam decidir realitzar el cribratge d'aquestes, en paral·lel amb els cribratges mostrats anteriorment amb la interacció C18-RCAN1-CnA, per identificar també disruptors de la interacció VIVIT-CnA.

En primer lloc es va posar a punt tant la interacció VIVIT-CnA com la competició de la interacció en presència de concentracions creixents de pèptid VIVIT no marcat, per confirmar que la interacció podia ser desplaçada (Figura 40). Donat que el pèptid natural a partir del

qual es va optimitzar el VIVIT és el pèptid SPRIEIT, en paral·lel a la caracterització de la interacció VIVIT-CnA també es va caracteritzar la saturació i el desplaçament de la interacció SPRIEIT-CnA (Figura 40A i 40B, interacció VIVIT-CnA i interacció SPRIEIT-CnA, respectivament). A partir de les dades obtingudes es van poder caracteritzar les  $K_d$  i  $IC_{50}$  d'ambdós pèptids essent pel pèptid VIVIT la seva  $K_d$   $0.63 \pm 0.01 \mu M$  i la  $IC_{50}$   $0.94 \pm 0.03 \mu M$ , mentre que pel pèptid SPRIEIT la  $K_d$  és  $6.25 \pm 0.07 \mu M$  i la  $IC_{50}$  és  $13 \pm 0.4 \mu M$ . La dada corresponent a la  $K_d$  del pèptid VIVIT obtinguda sota les nostres condicions està en concordança amb les dades publicades que descriuen que la seva  $K_d$  és de  $0.55 \mu M$  (Roehrl et al., 2004). A més, els resultats obtinguts mostren que la seqüència natural SPRIEIT és 10 cops menys afí per CnA que el pèptid VIVIT optimitzat, tal i com també ja s'havia descrit prèviament (Aramburu et al., 1998).



**Figura 40. A.** Corbes de saturació i de desplaçament de la interacció VIVIT-CnA.  
**B.** Corbes de saturació i de desplaçament de la interacció SPRIEIT-CnA.

### **3.7. Cerca de molècules amb potencial immunosupressor mitjançant cribratge de quimiotèques respecte la interacció VIVIT-CnA**

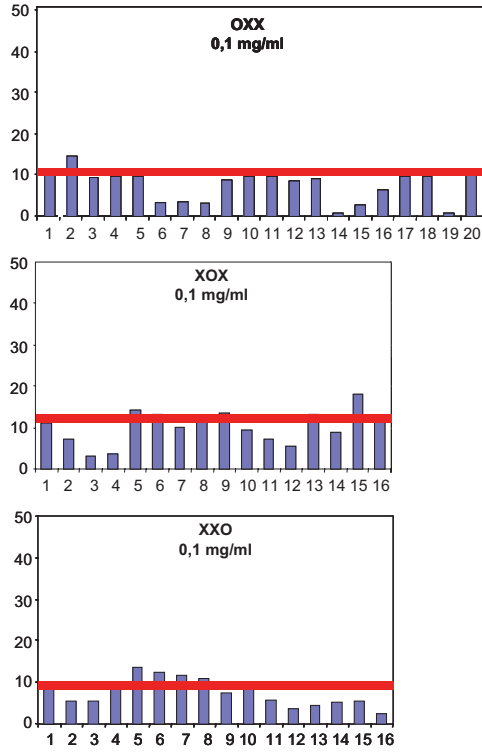
En paral·lel a la búsqueda de disruptors de la interacció C18-RCAN1-CnA detallada anteriorment es va realitzar també el cribratge de diverses quimiotèques envers la interacció VIVIT-CnA. Es van dur a terme aquests cribratges perquè aquesta interacció té un alt potencial immunosupressor i perquè havia constància prèvia de que s'havien pogut identificar molècules disruptores d'aquesta unió (Roehrl et al., 2004). En aquests cribratges es van emprar quimiotèques de mescles controlades i de composts sols.

#### **3.7.1. Cribratge de quimiotèques de mescles controlades en format de rastreig posicional**

La primera quimioteca que es va analitzar va ser la de trímers de peptoides que té format de rastreig posicional a una concentració de 0.1 mg/ml (Figura 41A), però no es va poder identificar cap mescla que disruptés la interacció significativament. A continuació, es va emprar la quimioteca d'hexapèptids de D-aminoàcids, però els resultats obtinguts tampoc van permetre dissenyar pèptids amb les seqüències definides (Figura 41B). Per últim es van assajar dues quimiotèques de mescles controlades d'estructures d'hèlix  $\alpha$  i de full  $\beta$  també en format de rastreig posicional, però cap mescla va disruptar significativament la interacció VIVIT-CnA (Figura 41C, a l'esquerra resultats corresponents a les estructures hèlix  $\alpha$  i a la dreta els de les estructures full  $\beta$ ).

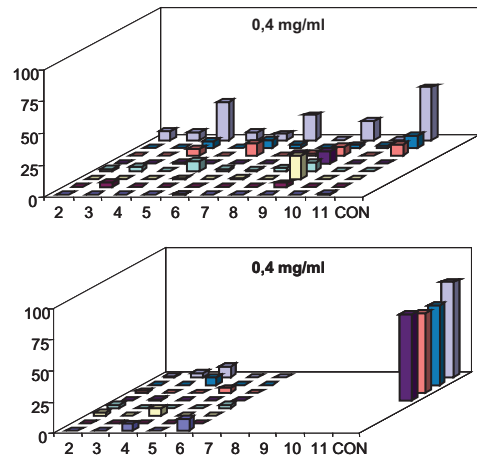
**A**

% Desplaçament interacció



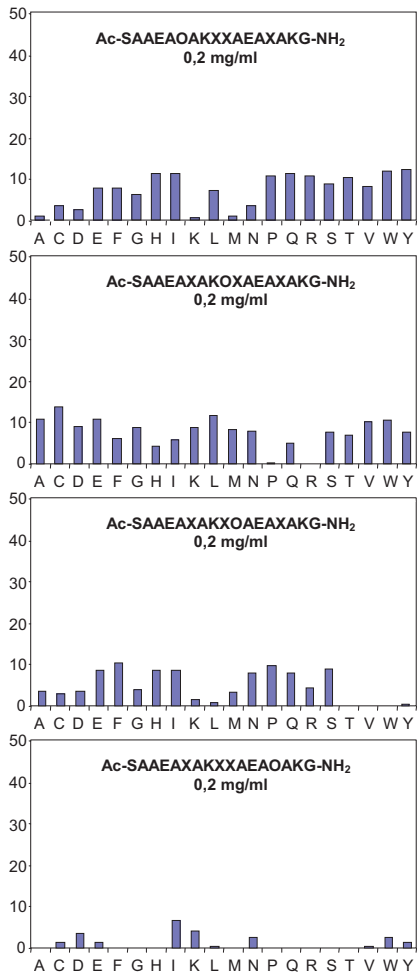
**B**

% Desplaçament interacció

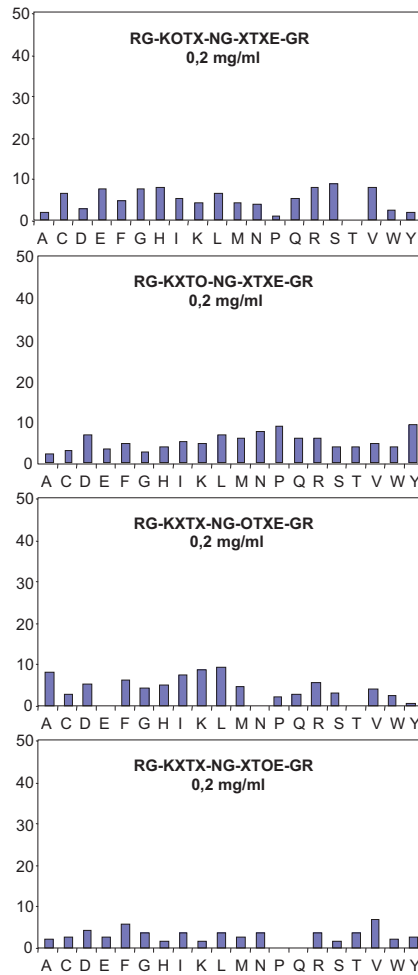


**C**

% Desplaçament interacció



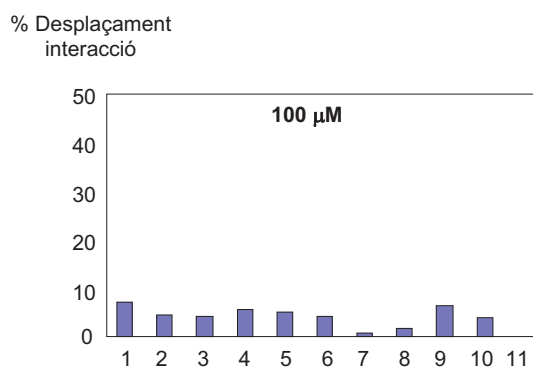
% Desplaçament interacció



**Figura 41.** Cribratge de diverses quimioteques de mesclades controlades en format de rastreig posicional amb la finalitat d'identificar disruptors de la interacció VIVIT-CnA. **A.** Trímers de peptoides de N-alkilglicines. **B.** Hexapèptids de D-aminoàcids. **C.** Estructures en forma de hèlix  $\alpha$  i full  $\beta$ .

### 3.7.2. Cribratge d'una col·lecció de composts sols

Per últim, es va realitzar el cribratge de la col·lecció de composts sols formada per sals de tetraalquilamoni amb càrrega positiva respecte la interacció VIVIT-CnA a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 42). Cap producte va desplaçar la interacció més d'un 10%.



**Figura 42.** Cribratge d'una quimioteca de composts sols formada per sals de tetraalquilamoni amb càrrega positiva respecte la interacció VIVIT-CnA.

En resum, el cribratge de diverses quimioteques respecte la interacció VIVIT-CnA no va aconseguir identificar cap disruptor que desplaçés dita interacció de manera significativa.





## DISCUSSIÓ



Aquest treball experimental ha permès caracteritzar des d'un punt de vista molecular i funcional les interaccions RCAN1-CnA i RCAN3-CnA i demostrar que el motiu CIC de les RCAN és el responsable directe de l'efecte immunosupressor vers la via de senyalització Cn-NFAT a limfòcits T humans. A més, s'ha dissenyat i optimitzat un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció C18-RCAN1-CnA que podria ser emprat com una nova eina per cercar nous fàrmacs amb potencial immunosupressor.

A continuació, es discutiran els resultats més rellevants obtinguts a partir del treball experimental realitzat. Aquelles dades incloses en els articles adjuntats a l'apartat de Resultats es descriuran de manera més concisa mentre que els resultats corresponents a les dades no publicades es descriuran més detalladament.

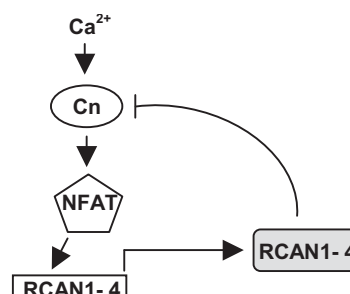
## 1. EXPRESSIÓ GÈNICA DIFERENCIAL DE RCAN1 I RCAN3

Tot i l'alta conservació de la seqüència dels gens *RCAN1* i *RCAN3* humans, la regulació de la seva transcripció és diferent.

### 1.1. RCAN1

Fuentes i col. van descriure l'existència de promotors alternatius pels diferents transcrits de *RCAN1* (Fuentes et al., 1997). Posteriorment, a múscul estriat es va descriure que la transcripció de *RCAN1-4* depèn de  $Ca^{2+}$ -Cn, mentre que la de *RCAN1-1*, no (Yang et al., 2000a). Això va fer que aquests autors suggerissin l'existència d'un cicle de retroalimentació negativa, en el qual la mateixa Cn estimularia la transcripció del seu propi inhibidor. Diversos autors han demostrat que l'expressió gènica de *RCAN1-4* s'indueix en presència d'un increment de la concentració intracel·lular de  $Ca^{2+}$  en altres teixits: a cervell, emprant línies cel·lulars d'astrocitoma i neuroblastoma (Fuentes et al., 2000) i feocromocitoma (Cano et al., 2005); en cèl·lules endotelials HUVEC a nivell de mRNA (Hesser et al., 2004; Minami et al., 2004) i a nivell de proteïna (Mitchell et al., 2007) i a múscul esquelètic i cor (Yang et al., 2000a).

Els resultats obtinguts al laboratori van mostrar que l'estimulació amb anti-CD3 i anti-CD28 o amb ionomicina+PMA de dues línies cel·lulars de limfòcits T humans, Jurkat i HuT 78, indueix l'expressió gènica a nivell de mRNA de *RCAN1-4* però no la de *RCAN1-1* (Article 1, Annex I, Figura 15). Aquestes dades coincideixen amb les obtingudes per altres autors a nivell de proteïna emprant cultius primaris de limfòcits T humans i cèl·lules Jurkat (Narayan et al., 2005).



**Figura 43.** Esquema proposat pel cicle de retroalimentació negativa de *RCAN1-4* en limfòcits T humans.

Aquestes dades permeten postular que, a l'igual que s'ha proposat en altres teixits, a limfòcits T humans podria existir també un cicle de retroalimentació negativa (Figura 43). De fet, tota via de senyalització requereix estímuls que la iniciïn i senyals que l'aturin i evitin que continuï permanentment activada. En aquest sentit, l'existència d'aquest cicle d'autoregulació de l'activació limfocitària per part de RCAN1-4 podria ser el responsable en part de finalitzar la síntesi de citokines que haurien estat necessàries per generar la resposta immune.

Fins al 2007, sempre s'havia considerat que RCAN1 era un tipus d'inhibidor endogen de Cn especialment interessant degut a que era l'únic descrit capaç d'establir aquest cicle de retroalimentació negativa. Recentment, s'ha demostrat que Carabin també pot establir el mateix cicle d'autoregulació vers Cn (Pan et al., 2007).

## 1.2. RCAN3

Pel que fa a RCAN3, els resultats experimentals obtinguts mostren que la seva expressió a nivell de mRNA no depèn de la via de  $Ca^{2+}$ -Cn (Article 2, Figura 2A). L'anàlisi d'una regió d'1.2 kb situada a 5' flanquejant del gen ha mostrat l'existència de tres llocs d'unió putatius per NFAT (Mulero et al., 2007). Cal recordar que l'expressió gènica dependent de NFAT requereix la presència de *clusters* d'elements de resposta a NFAT a les regions reguladores gèniques i que aquests siguin funcionals.

L'anàlisi d'aquesta regió, emprant el programa de predicció de llocs d'unió MatInspector versió 6.0 d'accés lliure disponible a la pàgina web <http://www.genomatix.de>, ha revelat que conté set llocs d'unió putatius a OCT-1, tres a GATA3, quatre a STAT6 i un a p53. A més, un anàlisi més ample incloent 5 kb prediu l'existència de vint-i-un llocs d'unió a OCT-1, nou a GATA3, vuit a STAT6, set a STAT5, sis a GATA1, nou a p53 i sis a GRE (per *glucocorticoid response element*). A partir d'aquestes dades obtingudes *in silico* es poden hipotetitzar dues coses:

- La transcripció de RCAN3, a l'igual que ja s'ha demostrat prèviament per RCAN1-1 (U et al., 2004), podria estar regulada per glucocorticoides degut a l'alt nombre de llocs d'unió predits amb el programa emprat, tot i que fins al moment, no s'ha demostrat experimentalment per RCAN3.

- La predicció de tants llocs d'unió a GATA1, GATA3, STAT5, STAT6 i OCT-1 suggereix que diverses vies de senyalització convergeixen en la regulació de l'expressió gènica de RCAN3, pel que podria estar implicada en diversos processos cel·lulars, inclòs el càncer. Diversos treballs han suggerit que STAT5 i STAT6 poden participar en el desenvolupament de càncers hematològics, leucèmies i limfoma de Hodgkin, respectivament (Dong and Tweardy, 2002; Feys et al., 2007). Altres autors han descrit que STAT5 i OCT-1 estableixen complexos i són responsables de la regulació de l'expressió de la ciclina D1, proteïna clau en la progressió del cicle cel·lular (Magne et al., 2003). A més, també s'ha descrit la participació de GATA3 en càncer de mama (Usary et al., 2004). Contràriament, l'existència de nou llocs d'unió

putatiu per p53 suggereix que l'expressió de *RCAN3* podria estar també regulada per p53, coneguda per la seva funció com a supressor tumoral. En aquest sentit, en els darrers anys també s'ha descrit que l'expressió d'una isoforma curta de GATA1, incapaç de regular l'expressió dels seus gens diana, és la responsable del desenvolupament d'un determinat tipus de leucèmia en pacients amb la Síndrome de Down (Muntean et al., 2006).

La predicció *in silico* de llocs d'unió de factors de transcripció no implica que aquests siguin funcionals *in vivo*. Una dada que avala la seva potencial funcionalitat és el grau de conservació en l'escala evolutiva. Així i tot, només la realització d'assaigs experimentals com ara l'anàlisi de l'expressió d'un gen marcador, sota el control del promotor i de successives delecions d'aquest, permetria confirmar la funcionalitat dels diferents elements de resposta predits bioinformàticament.

En conjunt, l'expressió gènica dels diferents membres de la família de proteïnes RCAN pot dependre de l'existència de diferents promotors per a cada membre i per a cada isoforma, la presència de diferents elements de resposta als seus respectius promotors, l'existència de diferents factors de transcripció expressats a cada teixit així com l'expressió diferencial dels membres de la família de les RCAN en diferents teixits, entre d'altres.

## 2. EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES RCAN

Els experiments realitzats en aquesta Tesi han permès identificar l'expressió de la proteïna RCAN1-1 endògena a la línia cel·lular Jurkat (Article 1, Figura 1), però en canvi la identificació de la proteïna RCAN3-2 ha estat més complicada (Article 2, Annex II).

Amb la finalitat de poder identificar la proteïna RCAN3-2 endògena, es van produir anticossos policlonals en ratolí contra un fragment de l'extrem N-terminal de RCAN3-2 humana. El fragment escollit comprenia una regió de 144 aminoàcids de longitud altament immunogènica i estava localitzat a l'exó 2 de RCAN3-2, que correspon a la zona no comú de les tres RCAN humanes, donat que les zones central i C-terminal són comuns per les tres proteïnes humanes (Article 2, Figura Suplementària). Possiblement, l'ús d'un fragment més curt o pèptid d'aquesta regió de RCAN3-2 hagués produït anticossos més específics que els obtinguts. Alternativament, la generació d'un anticòs monoclonal enlloc d'un policlonal hagués portat a obtenir probablement anticossos altament específics. Així i tot, l'anti-RCAN3-2 s'ha mostrat eficient tant alhora d'immunodetectar la proteïna transfectada HA-RCAN3-2 per transferència de *Western* com alhora d'immunoprecipitar-la (Article 2, Annex II, Figures 16 i 17), però la seva inespecificitat ha dificultat la identificació de RCAN3-2 a nivell endogen. En PBL s'ha detectat una banda amb una mobilitat electroforètica compatible amb la teòrica per RCAN3-2, però aquesta banda no s'ha detectat a línies cel·lulars de limfòcits T humans (Article 2, Annex II, Figura 19). Actualment, disposem d'un anticòs anti-RCAN3 recentment generat (Porta et al., 2007a) i cedit amablement pel grup de la Dra. Mariona Arbonés (Centre de Regulació Genòmica, Barcelona). L'utilització d'aquest anticòs ens ha permès demostrar recentment que RCAN3-2 s'expressa a PBL però no a cèl·lules Jurkat

(experiments realitzats per Sergio Martínez). Aquests resultats concorden amb les dades obtingudes amb el nostre anticòs anti-RCAN3-2. Caldria a continuació determinar a quin tipus cel·lular dels PBL s'expressa la RCAN3-2.

### 3. INTERACCIÓ DE LES PROTEÏNES RCAN AMB Cn

Per primer cop, s'ha descrit que la interacció RCAN1-1-Cn té lloc a nivell endogen i en condicions de sobreexpressió de RCAN1-1 a limfòcits T humans (Article 1, Figura 1). A més, també s'ha pogut identificar la interacció RCAN3-2-Cn en condicions de sobreexpressió de RCAN3-2 emprant tampons de lisi de cèl·lules eucariotes que no contenen Tritó X-100 (Article 2, Annex III, Figura 20).

Assaigs previs realitzats al laboratori emprant diferents construccions de la proteïna RCAN1-1 havien mostrat que la utilització d'un tampó de lisi que contenia Tritó X-100 pels assaigs de co-IP permetia la detecció de la interacció del motiu PKIIQT i Cn, però no la del motiu ELHA i Cn (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). En canvi, ambdues interaccions podien detectar-se sense dificultat i de manera independent mitjançant assaigs de tipus *pull down* (Article 1, Figura 2D). Aquestes dades suggereixen que la interacció HA-RCAN1-1-Cn detectada mitjançant co-IP emprant un tampó de lisi que contenia Tritó X-100, únicament era deguda a la presència del motiu PKIIQT a la proteïna RCAN1-1 sencera i no per la presència del motiu ELHA. Aquest fet justifica perquè inicialment no vam detectar la interacció HA-RCAN3-2-Cn per co-IP, donat que RCAN3-2 no conté el motiu consens PxlxxT de les RCAN, tot i que sí que conté el motiu ELHA (Article 2, Figura Suplementària). Va ser necessari canviar el detergent del tampó de lisi utilitzat per NP-40 o millor CHAPS, que és el detergent més suau dels tres utilitzats, per poder detectar la interacció HA-RCAN3-2-Cn per co-IP (Article 2, Annex III, Figura 20).

No sol ser estrany que el tipus de detergent emprat sigui determinant en la detecció d'algunes interaccions proteïna-proteïna. Aquesta dada suggereix que la interacció del motiu ELHA de les RCAN i Cn *in vivo* podria ser de baixa afinitat i/o transitòria.

### 4. MOTIUS DE LES RCAN QUE PARTICIPEN EN LA INTERACCIÓ AMB Cn

Fins al moment de realitzar aquest treball experimental, hi havia resultats controvertits en quant al motiu o motius que participen en la interacció RCAN1-Cn.

#### 4.1. El motiu FLISPP de les RCAN

Inicialment, el motiu FLISPP, que és la senya d'identitat de la família i que alguns autors han apuntat que s'assembla a les repeticions SP dels NFAT (Rothermel et al., 2000), va ser considerat com un possible lloc d'unió de RCAN1 amb Cn. Diversos treballs van demostrar que pèptids que contenen el motiu FLISPP poden interaccionar *in vitro* amb Cn (Gorlach et

al., 2000; Kingsbury and Cunningham, 2000; Lin et al., 2003; Vega et al., 2002). També s'ha demostrat que els 96 aminoàcids de l'extrem C-terminal de RCAN1, que inclouen el motiu FLISPP, són responsables de la interacció amb Cn (Rothermel et al., 2000). Contràriament, altres autors van demostrar que els 83 o bé els 57 aminoàcids de l'extrem C-terminal, que no inclouen el motiu FLISPP, són suficients per unir-se a Cn (Chan et al., 2005; Fuentes et al., 2000). En aquest sentit els nostres resultats també mostren que RCAN1 no interacciona amb Cn a través del seu motiu FLISPP (Article 1, Figura 2B i Article 2, Figura 2D), tot i que no es pot descartar que ho faci en el context de la proteïna sencera.

Encara que el motiu FLISPP no s'uneix físicament a Cn, en els darrers anys s'ha descrit que la seva funció podria ser més aviat la de modular la interacció RCAN-Cn. Alguns autors han demostrat que la fosforilació de les seves serines fa que la vida mitja de la proteïna sigui més curta i que moduli la capacitat de RCAN1 d'unir-se a Cn i d'inhibir la seva activitat fosfatasa *in vivo* (Abbasi et al., 2006; Genesca et al., 2003). A més, altres autors també han proposat que la fosforilació del motiu FLISPP afectaria a la localització intracel·lular de RCAN1 (Pfister et al., 2002).

El motiu FLISPP està conservat a tota l'*Eukarya* (Article 2, Figura Suplementària), la qual cosa suggereix que possiblement alguna o algunes de les funcions descrites pel motiu FLISPP de les RCAN humanes podrien estar conservades en altres membres de la família. Malgrat això, tampoc s'hauria de descartar que aquestes funcions estiguessin conservades només a vertebrats i que en invertebrats i eucariotes inferiors les funcions i el mecanisme de regulació del FLISPP poguessin ser diferents.

#### 4.2. Motius de les RCAN d'unió a Cn: el motiu ELHA i el motiu consens PxlxxT

Tal i com s'ha explicat a l'apartat anterior, diversos autors havien suggerit que la regió C-terminal de les RCAN és la responsable d'interaccionar amb Cn. Així i tot, d'altres havien suggerit que podien ser necessàries regions tant de l'extrem N com del C-terminal per interaccionar amb Cn, al menys en el cas particular de la isoforma RCAN1-4 (Vega et al., 2002). Per identificar quina o quines regions de RCAN1-1 són responsables de la interacció amb Cn es va realitzar una anàlisi exhaustiva de la seva seqüència emprant diversos mutants (Article 1, Figura 2A i Article 2, Figura 2C). Els assaigs de tipus *pull down* van permetre identificar dos motius nous d'interacció amb Cn prèviament no descrits, que estaven localitzats a l'extrem C-terminal de RCAN1-1 i que interaccionaven físicament amb Cn (Article 1, Figura 2D). El primer d'ells es va anomenar motiu ELHA, mentre que el segon es va anomenar motiu consens PxlxxT de les RCAN, donat que s'assembla al motiu PxlxIT dels NFAT.

Inicialment es va pensar que l'únic motiu d'unió de les RCAN amb Cn havia de ser el motiu consens PxlxxT, donada la seva similitud amb el motiu PxlxIT dels NFAT que està considerat el motiu d'ancoratge dels NFAT en Cn i donada la presència de motius similars al PxlxIT dels NFAT en diversos inhibidors endògens de Cn, com Cabin1, AKAP79 i A238L. Per

altra banda, s'havia predit que AKAP79 contenia a la seva seqüència diversos motius d'ancoratge en Cn. Dell'Acqua i col. van demostrar l'existència d'una regió de 45 aminoàcids, que comprèn els aminoàcids 315-360, responsable d'interaccionar amb Cn (Dell'Acqua et al., 2002). Segons els autors, aquesta regió contindria múltiples determinants responsables d'unir-se a Cn, entre ells la seqüència PIAIIT, que s'assembla al motiu consens PxlIT dels NFAT. En aquesta línia, també s'ha descrit recentment en un altre inhibidor endogen de Cn, Cabin1 de ratolí, l'existència d'un segon domini d'interacció amb ella. Així doncs, Cabin1 s'uniria a Cn a través de la regió que comprèn els aminoàcids 2117-2161 i que inclou la seqüència PEITVT, que s'assembla al motiu consens PxlIT dels NFAT, i també a través d'una altra regió que comprèn els aminoàcids 701-900 (Jang et al., 2007).

Potser l'existència de diversos llocs d'unió a Cn en els inhibidors endògens de Cn podria ser responsable en part de la gran afinitat que la majoria d'ells mostren per Cn. Malgrat això, no només els inhibidors de Cn presenten múltiples motius d'unió a ella, sinó que també als NFAT, substrats de Cn, s'han identificat dos motius d'unió a Cn, els motius LxVP i el PxlIT (Park et al., 2000). Les afinitats individuals de cada lloc d'unió per interaccionar amb Cn, així com el possible efecte sinèrgic que puguin establir entre ells, podria explicar l'alta afinitat d'aquests inhibidors per Cn, tot i que aquesta hipòtesi no ha estat demostrada experimentalment fins al moment. El que sí que s'ha demostrat recentment és que els motius LxVP i PxlIT dels NFAT presenten diferent afinitat entre ells per unir-se a Cn i també s'han descrit diferències entre els motius LxVP entre diferents membres de la família dels NFAT (Martinez-Martinez et al., 2006).

Mentre que la interacció RCAN1-1-Cn pot implicar la participació de dos motius, la de RCAN3-2-Cn només ocorre a través del motiu ELHA donat que no inclou la seqüència consens PxlIT de les RCAN, sinó la seqüència QKIAQT que no interacciona amb Cn (Article 2, Figura 2D). Intuïtivament, l'existència de dos motius d'interacció suggereix que potser la unió RCAN1-1-Cn pot estar més finament regulada que la de RCAN3. Aquesta regulació podria ser conseqüència, en part a canvis en els nivells d'afinitat d'ambdós motius CIC i PxlIT, i per tant, la interacció de Cn amb RCAN1 seria més elevada que la de RCAN3. Això no s'ha pogut confirmar, donat que el motiu PKIIQT de RCAN1 no interacciona *in vitro* amb cap de les tres Cn $\alpha$  emprades en aquest treball (Apartat Resultats, Figura 32). Això no ens ha permès avaluar ni la seva afinitat per Cn ni el seu possible efecte sinèrgic amb el motiu C18-RCAN1, que inclou el motiu ELHA, per unir-se a Cn, de manera similar a com alguns autors han suggerit que ocorre amb els motius LxVP i PxlIT de NFATc1 (Park et al., 2000).

El que sí que ens han mostrat els assaigs *in vitro* per anisotropia de fluorescència és que el pèptid C18-RCAN3 és lleugerament més afí per Cn que el C18-RCAN1 (Apartat Resultats, Figura 25), encara que en el context de la proteïna nativa potser que aquesta sigui diferent.



#### 4.2.1. El motiu ELHA

El motiu ELHA és un motiu d'interacció de les RCAN amb Cn exclusiu de vertebrats i la seva seqüència consens en les RCAN de mamífers, és KYELHA[G-A]T[D-E][S-T]TPS (Article 2, Figura 1A i Article 1, Figura 2E). La comparació d'aquest motiu amb els altres motius d'interacció amb Cn coneguts fins al moment de realitzar aquest treball, LxVP i PxlxIT, o be amb el motiu consens PxlxxT de les RCAN també identificat a partir dels nostres resultats, no mostra cap similitud amb ells. A més, l'anàlisi detallada dels altres llocs d'interacció amb Cn descrits pels inhibidors endògens, AKAP79 i Cabin1, tampoc mostra cap similitud ni amb l'ELHA ni amb cap altre motiu d'unió a Cn.

Per últim, la utilització del programa Blastp (per *protein-protein BLAST*) disponible a la pàgina web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ha permès comparar els motius ELHA de RCAN1 i de RCAN3 vers la base de dades de proteïnes Swissprot. Aquesta anàlisi no ha mostrat similitud amb cap dels inhibidors endògens de Cn identificats fins al moment. Particularment interessant és el fet de que la proteïna AKAP13 (per *protein kinase Anchoring protein 13*), que pertany a la mateixa família que AKAP79, conté la seqüència TPELHTATDYRDG que presenta certa identitat amb els aminoàcids del motiu ELHA de RCAN1. Donat que les proteïnes d'aquesta família solen establir complexos multiproteics grans, podria ser que AKAP13 interaccionés amb PKA i també amb Cn, de manera similar a com s'ha demostrat prèviament per AKAP79 (Coghlan et al., 1995).

#### 4.2.2. El motiu C18

El motiu ELHA interacciona amb Cn però no inhibeix a Cn (Article 1, Figura 3 i Article 2, Figura 3). Aquest efecte inhibidor només es detecta quan el motiu ELHA (13 aminoàcids) es troba en un context més ampli, com ara el motiu C18 (21 aminoàcids) o encara més ampli, el motiu CIC (28 aminoàcids de RCAN1-1 i 26 aminoàcids de RCAN3-2). Per aquesta raó es va realitzar la caracterització de la interacció dels motius C18 de les RCAN amb Cn enlloc de fer la de la interacció del motiu ELHA amb Cn.

El motiu C18 està conservat en les proteïnes RCAN de vertebrats la qual cosa suggereix la conservació funcional del seu efecte inhibidor en aquests membres de la família (Article 2, Figura Suplementària). En detall, la seqüència humana del pèptid C18-RCAN1 emprat és KYELHAATDTTPSVVHVHVCES mentre que la del pèptid C18-RCAN3 és KYELHAGTESTPSVVHVHVCES. La comparació de les seqüències mostra l'existència de tres substitucions. A dues d'elles, el glutàmic per l'aspàrtic (E206D) i la serina per la treonina (S207T), la naturalesa del residu es manté en el canvi, donat que en el primer cas, ambdós són aminoàcids àcids amb una càrrega negativa i en el segon tots dos són aminoàcids neutres polars susceptibles de ser fosforilats. En canvi, la substitució de la glicina per l'alanina (G204A) podria ser responsable en part del comportament lleugerament diferent detectat *in vitro* entre els dos pèptids C18.

#### 4.2.2.1. Els pèptids C18 de les RCAN adopten una conformació *random coil*

Els nostres resultats mostren que els pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 estan desestructurats en solució (Apartat Resultats, Figura 22). Aquestes dades coincideixen amb les obtingudes prèviament també per difracció circular emprant la construcció RCAN1-1(170-252) (dades no mostrades, experiments realitzats pel Dr. Joaquim Messeguer i el Dr. Jordi Bujons). A més, també estan en concordança amb els resultats publicats per Chan i col. emprant els 57 aminoàcids corresponents a l'exó 7 de RCAN1 (Chan et al., 2005). El fet de que ambdós pèptids adoptin una conformació *random coil* suggereix que constituïrien estructures flexibles que podrien adaptar-se de manera adient al lloc d'unió a Cn. La presència d'altres concentracions de trifluoroetanol (TFE) o metanol (MeOH), indueix el plegament a full  $\beta$  d'ambdós pèptids, però curiosament, en totes les condicions experimentals analitzades, és el pèptid C18-RCAN3 el que sempre tendeix a estar més desestructurat (Apartat Resultats, Figura 22). Tal i com s'ha comentat a l'apartat anterior, el pèptid C18-RCAN3 conté una glicina a la seva seqüència mentre que el C18-RCAN1, no. La glicina és l'aminoàcid més petit dels 20 aminoàcids naturals, l'únic no quiral i l'únic que conté un àtom d'hidrogen a la seva cadena lateral, la qual cosa li confereix flexibilitat. Possiblement, la presència d'aquesta glicina afavoreix que el pèptid C18-RCAN3 estigui lleugerament més desestructurat que el pèptid C18-RCAN1.

#### 4.2.2.2. Els pèptids C18 de les RCAN interaccionen amb la CnA $\alpha$ (2-347)mutada

Els resultats obtinguts han permès demostrar que els pèptids C18 de les RCAN interaccionen amb la CnA, sense requerir la presència ni de la CnB ni de la CaM. A més, la regió de CnA $\alpha$  implicada amb dita interacció es troba compresa entre els aminoàcids 2-347 (Apartat Resultats, Figura 24).

Fins al moment alguns autors havien suggerit que la regió *linker* de CnA $\beta$  podria estar implicada en la interacció amb RCAN1 (Fuentes et al., 2000). Els nostres resultats indiquen que l'existència dels tres canvis d'aminoàcid Y341S, L343A i M347D al *linker* de la CnA $\alpha$  emprada, no afecten a la interacció entre els pèptids C18 de les RCAN i CnA $\alpha$ . A més, l'afinitat dels pèptids C18 de les RCAN per la CnA $\alpha$ (2-348)wt, que no conté les tres substitucions al linker, és similar a l'afinitat per la CnA $\alpha$ (2-347)mutada (Apartat Resultats, Figura 24B).

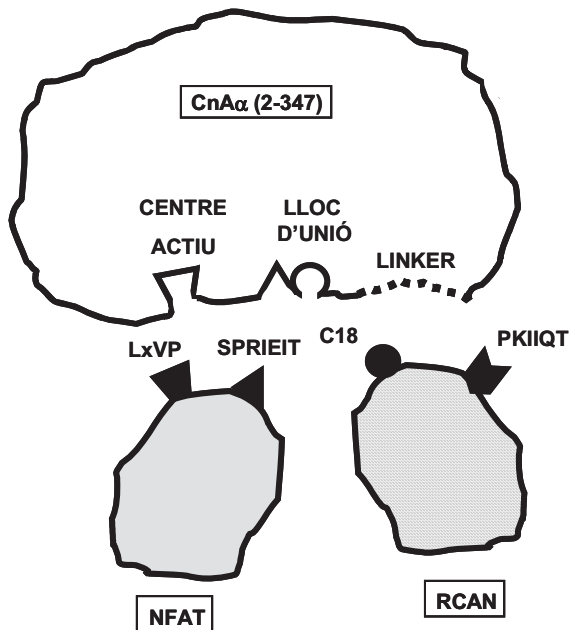
El fet de que els pèptids SPRIET (Apartat Resultats, Figura 28) i VIVIT competeixin les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-Cn, i el mateix però a l'inrevés, suggereix que aquests pèptids podrien interferir-se entre ells alhora d'unir-se a Cn. Fins al moment, alguns autors havien suggerit que la regió *linker* de Cn era essencial per la unió dels NFAT i dels inhibidors endògens de Cn, Cabin1 i AKAP79 (Rodriguez et al., 2005). Molt recentment, s'ha descrit que el pèptid VIVIT no interacciona amb el *linker* de CnA $\alpha$ , sinó que ho fa a través

d'una regió propera a l'extrem N-terminal del *linker* de la CnA $\alpha$  (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007). Aquestes dades juntament amb el fet de que els pèptids C18 de les RCAN interaccionen amb les tres CnA $\alpha$  emprades, tant en presència com en absència de les tres substitucions al *linker*, suggereix que aquests pèptids podrien interaccionar amb la CnA $\alpha$  a través d'alguna regió situada fora del *linker*, tot i que no es pot descartar que la interacció ocorri en el *linker*. Per tant, la presència de les substitucions descrites no indueix cap canvi conformacional en l'enzim que afecti significativament a les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA.

Per altra banda, els complexos fàrmac-immunofilina, que inhibeixen l'activitat fosfatasa de Cn bloquejant l'accés dels substrats al centre actiu de l'enzim, ni el pèptid RII, que és substrat de CnA, competeixin les unions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-CnA. A més, el fet de que el pèptid LxVP, que s'ha descrit recentment que inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn (Martinez-Martinez et al., 1997), només competeixi a altes concentracions les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN amb Cn suggereix que aquests pèptids no s'estarien interferint entre ells alhora d'unir-se amb Cn. Totes aquestes dades estan en concordança amb altres resultats obtinguts al laboratori que demostren que el pèptid C18-RCAN1 no inhibeix l'activitat fosfatasa de Cn *in vitro* vers el fosfopèptid RII (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). Per tant, els resultats anteriors suggereixen que l'establiment de les interaccions C18-RCAN1-CnA i C18-RCAN3-Cn no requereixen la participació directe del centre actiu de Cn.

Tots els resultats obtinguts permeten suggerir l'existència d'un escenari en el qual les proteïnes RCAN i NFAT, podrien interaccionar amb Cn a través de regions properes o parcialment superposades que implicarien la zona pròxima al *linker*. Una altra possibilitat que no s'hauria de descartar seria que la unió de les proteïnes RCAN o els NFAT a Cn en alguna d'aquestes regions produís un canvi conformacional de l'enzim que afectés la unió de l'altra proteïna.

Pel que fa a l'existència de solapament dels llocs d'unió de les RCAN i els NFAT en Cn, a la Figura 44 es proposa un model en el qual els pèptids C18 de les RCAN i el pèptid SPRIEIT podrien interaccionar amb Cn a través de regions properes o parcialment superposades. Aquesta o aquestes regions podrien trobar-se localitzades a l'extrem N-terminal flanquejant de la regió *linker* de Cn. En canvi, la regió d'interacció del pèptid LxVP podria estar allunyada de la dels pèptids C18 de les RCAN i afectar al centre actiu, donada la capacitat del pèptid LxVP d'inhibir l'activitat fosfatasa de Cn sobre RII (Martinez-Martinez et al., 2006).



**Figura 44.** Hipòtesi de model d'interacció per RCAN i NFAT amb Cn. El pèptid LxVP està representat amb un trapezi, el SPRIEIT amb un triangle, el C18 amb un cercle i el PKIIQT amb una hexàgon irregular. La línia discontinua representa la regió *linker* continguda a la CnAα(2-347)mutada emprada.

L'altre possibilitat implicaria que potser la unió dels pèptids C18 amb Cn podria requerir la participació d'altres regions allunyades de la proposada. En aquest cas, les competicions observades vers els pèptids SPRIEIT i VIVIT serien degudes probablement a fenòmens d'al·lostèria, més que no pas a la superposició de regions d'interacció amb Cn. Justament aquest mecanisme és el que s'ha proposat per explicar l'efecte inhibidor de les molècules INCA vers la interacció VIVIT-Cn (Kang et al., 2005b). Aquestes molècules van ser identificades inicialment mitjançant el cribratge d'una quimioteca que cercava disruptors de la interacció VIVIT-Cn (Roehrl et al., 2004). Estudis posteriors han demostrat que els INCA interaccionen amb el residu cisteïna de la posició 266 que està situat fora de la regió d'interacció del pèptid VIVIT en Cn, que està localitzada entre els residus 327-333 o 329-333, segons diversos treballs (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007). Els autors proposen que la interacció dels INCA amb Cn a través d'aquest residu provocaria un canvi conformacional de la regió de Cn que interacciona amb el pèptid VIVIT, abolint la seva interacció.

Pel que fa al pèptid PKIIQT, a la Figura 44 s'ha volgut reflectir la possibilitat de que no interaccioni amb la CnAα(2-347)mutada emprada. Aquesta hipòtesi es discutirà en detall en l'apartat 4.2.3.1.

En els darrers anys, també s'havia proposat que la regió *linker* de Cn o alguna regió propera era crucial per la interacció de Cabin1 i AKAP79 (Rodríguez et al., 2005). Aquests autors suggereixen que diverses proteïnes inhibidores de Cn, les RCAN, Cabin1 i AKAP79, podrien interaccionar amb ella a través de regions properes o parcialment solapants. L'existència d'un ventall ampli de proteïnes capaces d'inhibir Cn permetria la regulació fina de la seva activitat, donat que Cn és un enzim clau en multitud de processos biològics que tenen lloc en diversos teixits. L'elecció d'un o altre inhibidor endogen de Cn en cada moment

podria dependre del tipus cel·lular en el qual s'expressen, de la localització intracel·lular de Cn, de la interacció d'aquestes proteïnes inhibidores de la Cn amb d'altres proteïnes que poguessin regular la seva localització cel·lular o dels estímuls que rep la cèl·lula, entre d'altres.

#### **4.2.2.3. Les interaccions C18-RCAN1-Cn i C18-RCAN3-Cn *in vivo* poden requerir modificacions post-traduccionals**

Els nostres resultats mostren que la fosforilació del motiu C18 de les RCAN no és indispensable perquè interaccioni amb CnA, donat que *in vitro* i per *pull down* s'han pogut determinar les interaccions C18-RCAN1-Cn i C18-RCAN3-Cn sense dificultat (Apartat Resultats, Figura 25 i Figura 37).

Malgrat això, la utilització del programa de predicció de llocs de fosforilació disponible a la pàgina web <http://networkin.info> permet postular que els dos pèptids C18 de les RCAN són susceptibles de ser fosforilats per diferents quinases. Aquest programa prediu l'existència en el pèptid C18-RCAN1 d'un lloc de fosforilació per p38, un altre per PKC i un altre per CK2, tots ells amb una puntuació superior a 0.9, en un rang de 0 a 1, mentre que pel pèptid C18-RCAN3, únicament prediu un lloc de fosforilació per CK1 i un altre per CK2, tots dos amb una puntuació de 0.75. Tot i aquestes prediccions *in silico*, això no implica que existeixin *in vivo*, de tal manera que caldria la confirmació experimental d'aquests resultats. El que sí s'ha demostrat és la capacitat de la PKA de fosforilar *in vitro* els pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 (Apartat Resultats, Figura 23). Restaria confirmar si aquestes fosforilacions tenen lloc *in vivo*.

Pel que fa a la Cn, sembla que no és indispensable que estigui fosforilada per interaccionar amb els pèptids C18 de les RCAN (Apartat Resultats, Figura 25), però quan ho està, interacciona preferentment amb el motiu C18 de RCAN1 (Apartat Resultats, Figura 37, veure la mobilitat electroforètica menor de la banda corresponent a Cn en els carrils PD de l'assaig *pull down*). Aquestes dades suggereixen que l'existència de fosforilacions *in vivo* en la CnA podria modular la interacció amb les proteïnes RCAN, tot i que la seva rellevància funcional està per determinar.

#### **4.2.2.4. Els pèptids C18 de les RCAN són notablement afins per Cn**

S'ha posat a punt un assaig de la interacció RCAN-Cn per anisotropia de fluorescència que ha permès la caracterització de les constants d'afinitat i de dissociació dels pèptids C18 de RCAN1 i RCAN3 per Cn. A més, també s'ha dissenyat un assaig similar però amb les interaccions dels pèptids SPRIET i VIVIT dels NFAT amb Cn. En aquest context, els resultats obtinguts per la interacció VIVIT-Cn corroboren els resultats obtinguts anteriorment per altres autors. En concret, les nostres dades indiquen que la  $K_d$  del pèptid VIVIT és de 0.55  $\mu\text{M}$  mentre que les dades publicades indiquen que és de 0.63  $\mu\text{M}$  (Roehrl et al., 2004). Pel que fa

al pèptid SPRIEIT, els nostres assaigs han mostrat que la seva  $IC_{50}$  és de 13  $\mu M$ . Altres autors han mostrat que en assaigs de competició dels pèptids SPRIEIT-25 i SPRIEIT-13 vers la interacció entre Cn marcada radioactivament ( $^{125}I$ -Cn) i la proteïna de fusió GST-NFATc2 (1-400) la seva  $IC_{50}$  és de 12  $\mu M$  (Aramburu et al., 1998). A més, la construcció GST-NFATc2 tot i que inclou els dos motius d'interacció de NFAT en Cn, els motius LxVP i PxlIT, és la isoforma que conté un motiu LxVP que és incapaç d'unir-se a Cn, mentre que el seu PxlIT sí que ho fa (Martinez-Martinez et al., 2006). Així doncs, el valor de la  $IC_{50}$  determinat inicialment, tot i emprar una construcció que inclou els dos motius, correspondria únicament al motiu SPRIEIT, i coincidiria amb el valor obtingut en les nostres condicions.

Les interaccions proteïna-proteïna fisiològiques es considera que presenten unes afinitats que oscil·len entre nM i  $\mu M$ . En aquest sentit, les  $K_d$  dels pèptids C18 de les RCAN, calculades a partir dels nostres experiments, es trobarien incloses dins del rang micromolar baix. En canvi, altres autors han demostrat emprant la mateixa tècnica que nosaltres que tant la proteïna RCAN1 sencera com l'exó 7 de RCAN1 tenen unes  $K_d$  aparent vers la  $CnA\alpha(1-347)$  de l'ordre de 24-29 nM, respectivament (Chan et al., 2005). Aquestes diferències en les constants de dissociació podrien ser degudes a que el motiu PKIIQT de RCAN1 en el context de la proteïna nativa, podria estar afavorint encara que de manera indirecta la interacció amb CnA. Alternativament, podria ser que el pèptid C18 sol pogués ser menys eficient en interaccionar amb Cn simplement perquè la seva seqüència fos massa curta i li faltin aminoàcids addicionals en la interacció. En conjunt, aquestes dades suggereixen que l'acotament de la regió d'interacció de RCAN1 en Cn al pèptid C18, podria comportar certa pèrdua d'afinitat de l'inhibidor per la seva diana.

Tot i això, els pèptids C18 així com la proteïna RCAN1 sencera mostren una alta afinitat per Cn. Segons alguns autors això podria estar en concordança amb la funció fisiològica d'inhibidor endogen de Cn atribuïda a RCAN1. En concret, aquests autors postulen que el fet de que el motiu SPRIEIT tingui una baixa afinitat per Cn seria necessari perquè la cèl·lula pogués respondre als estímuls ambientals i evitar l'activació constitutiva dels NFAT (Hogan et al., 2003). De fet la substitució en la proteïna NFAT de la seqüència SPRIEIT per la seqüència VIVIT, que és la versió altament afí de la seqüència natural SPRIEIT, promou la seva desfosforilació i activació, fins i tot en cèl·lules no estimulades (Aramburu et al., 1999). Sembla clar que l'evolució ha seleccionat una interacció NFAT-Cn amb moderada afinitat per assegurar la reversibilitat de la interacció així com evitar l'activació inapropiada de la via en presència d'estímuls que estiguin per sota del llindar d'activació. Així doncs, aquests autors han suggerit que diferents funcions, com la de ser substrat o inhibidor de Cn, podria implicar tenir  $K_d$  majors o menors en cada cas. A més, les afinitats mostrades per altres pèptids o seqüències presents en d'altres inhibidors endògens de Cn, també apunten cap aquesta idea. Kashishian i col. van demostrar que un fragment de la proteïna AKAP79 (aminoàcids 108-427) podia desplaçar la interacció AKAP79-Cn amb una  $IC_{50}$  de 272 nM (Kashishian et al., 1998), mentre que el mateix grup posteriorment, va demostrar que pèptids de vora 20 aminoàcids que inclouen la seqüència PIAIIT o properes, desplaçaven dita interacció amb unes  $IC_{50}$  entre

1.5-3.5  $\mu\text{M}$  (Dell'Acqua et al., 2002). Miskin i col. també van demostrar que la  $\text{IC}_{50}$  d'un pèptid de 14 aminoàcids que inclou la seqüència PKIIIT és de 0.6  $\mu\text{M}$  vers la interacció A238L-Cn (Miskin et al., 2000). Tot i les diferents tècniques emprades en els diferents treballs i les diferents proteïnes analitzades, els resultats obtinguts mostren que els diferents inhibidors endògens de Cn presenten altes afinitats per unir-se a la fosfatasa i que els nostres valors de  $\text{IC}_{50}$  pels pèptids C18 de les RCAN presenten una afinitat dins de l'ordre de magnitud descrit per altres inhibidors endògens dins d'aquesta via de senyalització.

#### 4.2.3. El motiu consens PxlxxT de les RCAN

El motiu consens PxlxxT de les RCAN, amb similitud amb el motiu consens PxlxIT dels NFAT d'ancoratge a Cn, tot i que no conté la isoleucina de la posició 5 considerada crucial en la interacció NFAT-Cn (Aramburu et al., 1998), interacciona clarament amb aquest enzim (Article 1, Figura 2D).

A l'igual que el motiu C18 de les RCAN, el motiu consens PxlxxT està restringit només a les RCAN de vertebrats. De manera excepcional, l'anàlisi de genòmica comparada ha mostrat que també està present en la seqüència de l'ortòleg d'*Apis mellifera*, però no a *Drosophila melanogaster* ni a *Anopheles gambiae*, així que restaria comprovar experimentalment la seva capacitat d'unió a Cn (Article 2, Figura Suplementària).

RCAN1 i RCAN2 contenen una glutamina a la posició cinquena enlloc de la isoleucina present al motiu consens PxlxIT dels NFAT, la qual cosa suposa la presència d'un aminoàcid polar sense càrrega (glutamina) enlloc d'un apolar (isoleucina) a la seqüència PKIIQT. Tot i això, aquest canvi respecte al motiu PxlxIT dels NFAT no és suficient com per abolir la interacció del motiu PKIIQT de RCAN1 amb Cn (Article 1, Figura 2D).

Per contra, RCAN3 conté dos residus diferents a la seva seqüència en comparació amb la seqüència consens PxlxIT dels NFAT. Aquests es localitzen a la primera i a la cinquena posició del motiu i suposen un canvi d'una prolina i d'una isoleucina, del motiu PxlxIT dels NFAT per glutamina, respectivament. La seqüència resultant és QKIAQT. Aquesta seqüència QKIAQT és incapaç totalment d'interaccionar amb Cn (Article 2, Figura 2D). En canvi, la glutamina present a la posició 5 del motiu consens PxlxxT de RCAN1 li permet interaccionar clarament amb Cn (Article 1, Figura 2D). Un possible responsable de que RCAN3 no interaccioni amb Cn a través d'aquesta regió podria ser la manca de la prolina de la primera posició del motiu consens. En aquest sentit, diversos treballs previs han mostrat la importància d'aquest residu prolina en el motiu consens de NFAT i de A238L (Aramburu et al., 1999; Miskin et al., 2000). A més, recentment la caracterització de l'estructura de la interacció del pèptid VIVIT amb Cn ha confirmat que la prolina del motiu consens PxlxIT és un aminoàcid crucial en aquesta interacció (Li et al., 2007; Takeuchi et al., 2007). Naturalment diferents proteïnes, els NFAT o les RCAN en aquest cas, poden tenir diferents requeriments de conservació de determinats aminoàcids per interaccionar amb Cn.



#### 4.2.3.1. El pèptid PKIIQT no interacciona amb la CnA $\alpha$ (2-347) mutada *in vitro*

Inicialment, la gran similitud existent entre el motiu consens PxlIT dels NFAT i el motiu PKIIQT de RCAN1 i RCAN2 ens va portar a pensar que aquests motius podrien interferir-se entre ells alhora d'interaccionar amb Cn. Contràriament, les dades experimentals que es van obtenir amb les diferents aproximacions *in vitro* no van confirmar la hipòtesi inicial, ja que el pèptid PKIIQT no competeix la interacció SPRIEIT-Cn i ni tan sols interacciona amb cap de les tres CnA $\alpha$  emprades (Apartat Resultats, Figura 31 i Figura 32). Aquests resultats es poden interpretar de diverses maneres:

##### - El plegament del pèptid PKIIQT:

El pèptid PKIIQT conté una prolina a la primera i a la tercera posició del seu extrem N-terminal (Apartat Materials i Mètodes, Taula 9, veure seqüència). La prolina és un aminoàcid que conté un anell a la seva cadena lateral que li permet ciclar-se sobre l'esquelet peptídic, la qual cosa provoca una restricció conformacional que podria comportar que el plegament del pèptid no fos l'adequat *in vitro* i podria justificar perquè el pèptid PKIIQT no interacciona amb Cn. En aquest sentit, cal recordar que exactament aquest pèptid és el que és capaç d'interaccionar amb Cn per *pull down* (Article 1, Figura 2D). L'única diferència recau en el fet de que al seu extrem N-terminal conté la proteïna GST. Potser la presència de la GST podria facilitar d'alguna manera un plegament més correcte del pèptid. Possiblement, la mutació i/o allargament de la seva seqüència alguns residus més al seu extrem N-terminal, podria permetre avaluar si aquestes prolines són crítiques en la interacció del pèptid PKIIQT amb Cn *in vitro* en el nostre assaig.

##### - La CnA $\alpha$ (2-347)mutada:

Tot i que la construcció CnA $\alpha$ (2-347)mutada és capaç d'interaccionar amb tots els pèptids utilitzats en aquest treball, inclòs els de tipus PxlIT dels NFAT (pèptid SPRIEIT i VIVIT), podria ser que els residus concrets implicats en la interacció de Cn amb el pèptid PKIIQT, no adoptessin la conformació que tenen a la proteïna nativa, donada que aquesta proteïna s'ha expressat en bacteris. Una altra possibilitat seria que l'existència d'alguna modificació post-traducciona en la CnA, com ara fosforilacions, fos indispensable per la interacció amb el pèptid PKIIQT, donat que aquesta interacció s'ha detectat per co-IP (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda) i per *pull down* (Article 1, Figura 2D), però no mitjançant assaigs d'anisotropia de fluorescència (Apartat Resultats, Figura 32). També podria ser que necessités de la participació de la CnB o de la CaM en l'establiment de la interacció PKIIQT-Cn o que requerís part de la seqüència aminoacídica de l'extrem C-terminal de la CnA $\alpha$ , absent en la proteïna CnA $\alpha$ (2-347)mutada utilitzada en els assaigs.

Segons els nostres resultats, semblaria que la regió *linker* de Cn podria no participar en la interacció de Cn amb el pèptid PKIIQT, donat que tant la seqüència nativa d'aquest



*linker* com la presència de mutacions en ell, no permeten que s'estableixi la interacció PKIIQT-Cn (Apartat Resultats, Figura 32). Per altra banda, els assaigs d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT han mostrat que el motiu PKIIQT no inhibeix la interacció de NFATc2 amb Cn i com a conseqüència NFAT pot translocar a nucli (Article 1, Figura 3B). Aquesta dada demostra que ambdós motius no s'interfereixen alhora d'interaccionar amb Cn i suggereixen que ambdues regions d'unió en Cn podrien estar separades espacialment.

Així doncs, potser el que podria estar passant seria que les tres Cn $\alpha$  emprades, que comprenen els aminoàcids 2-348, no contenen la regió utilitzada pel pèptid PKIIQT per interaccionar amb Cn. Altres autors han demostrat mitjançant un assaig de doble híbrid fet a mamífers emprant deleccions seriades de la seqüència de la Cn $\beta$  que sembla que existeixin dues regions a Cn importants en la interacció amb RCAN1: la regió *linker* i una altra localitzada a l'extrem C-terminal de Cn (Fuentes et al., 2000). A més, altres resultats obtinguts en el laboratori també mostren que una proteïna de fusió de RCAN1-1 que inclou el motiu PKIIQT interacciona per *pull down* amb els residus 21-383 de la Cn $\beta$  (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). Així doncs, a partir d'aquests resultats es podria hipotetitzar que el motiu PxlxxT de les RCAN interacciona amb Cn $\alpha$  a través d'alguna regió localitzada entre els aminoàcids 349-383.

La resolució tridimensional de l'estructura de la interacció entre el pèptid PKIIQT i la CnA sencera podria aclarir els resultats obtinguts. Com el lloc d'unió del pèptid PKIIQT en Cn és diferent del lloc d'unió del motiu consens PxlxIT dels NFAT, això explica que ambdós motius puguin interaccionar amb Cn però no es competeixin entre ells.

Fins al moment, s'havia considerat la possibilitat de que els inhibidors de Cn, AKAP79, Cabin1 i A238L, que contenen seqüències similars al motiu consens PxlxIT dels NFAT, podien interaccionar amb Cn a través de regions properes a l'emprada pel motiu consens PxlxIT (Rodriguez et al., 2005). En canvi, les dades experimentals obtingudes amb el motiu PxlxxT de les RCAN apunten a que la seva regió d'unió en Cn no estaria propera a la del motiu consens PxlxIT dels NFAT. En aquest sentit, Cabin1 conté la seqüència PEITVT, que coincideix amb el motiu consens PxlxxT de les RCAN. A diferència del motiu PKIIQT de RCAN1, el motiu PEITVT de Cabin1 sí que inhibeix la via de senyalització Cn-NFAT *in vivo* (Jang et al., 2007). Potser el fet de que en Cabin1 la naturalesa del residu es mantingui en el canvi de la posició 5 del motiu consens PxlxIT dels NFAT (una isoleucina per una valina) podria fer que aquest motiu PEITVT encara pogués interaccionar a través d'alguna regió propera a la utilitzada pel motiu consens PxlxIT dels NFAT. Així doncs, tant el residu substituït com la naturalesa del canvi de residu podrien implicar diferències en les interaccions de diversos motius similars amb Cn.

#### 4.2.3.2. La fosforilació del motiu PKIIQT no és indispensable per interaccionar amb Cn

El fet de que la interacció PKIIQT-Cn pugui ser detectada per co-IP (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda) i per *pull down* (Article 2, Figura 2D) suggereix que l'estat de fosforilació del motiu PKIIQT no afecta directament a la seva interacció amb Cn. Tot i això, no es pot descartar que alguna modificació post-traducciona del motiu PKIIQT exerceixi algun efecte modulador vers dita interacció. De fet la utilització del programa de predicció de llocs de fosforilació disponible a la pàgina web <http://networkin.info> prediu l'existència d'un lloc de fosforilació per PKC al residu treonina fixat del motiu consens PxlxxT de les RCAN, de tal manera que tant la seqüència PKIIQT de RCAN1 com la seqüència QKIAQT de RCAN3 podrien ser susceptibles de ser fosforilades per aquesta quinasa, tot i que la puntuació per RCAN1 és de 0.913 mentre que la de RCAN3 és de 0.763. Per altra banda, tal com s'ha comentat a l'apartat anterior no s'hauria de descartar que l'estat de fosforilació de la Cn fos important en la interacció PKIIQT-Cn.

### 5. LES RCAN INHIBEIXEN L'ACTIVACIÓ LIMFOCITÀRIA

Els assaigs *in vivo* d'inhibició de la translocació nuclear de NFAT van mostrar que ni el motiu ELHA ni el motiu PKIIQT inhibeixen la via de senyalització Cn-NFAT (Article 1, Figura 3 i Article 2 Figura, 3B) mentre que el motiu C18 de les RCAN sí ho fa (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). El fet de que el motiu PKIIQT no inhibeixi la translocació de NFAT podria suggerir que el seu mecanisme d'acció vers Cn podria ser diferent del mecanisme d'acció del motiu consens PxlxIT dels NFAT vers Cn.

Pel que fa als motius ELHA i C18, l'única diferència entre ambdós motius recau en l'extrem C-terminal del C18, donat que aquest últim conté 8 residus més que el motiu ELHA, la seqüència dels quals és VVVHVCEs. Aquestes dades suggereixen que existiria algun efecte en aquests aminoàcids, absents en el motiu ELHA, que afectarien a la capacitat dels pèptids C18 d'inhibir *in vivo* la via de senyalització Cn-NFAT, potser afavorint el correcte plegament del pèptid o participant en l'establiment d'una interacció més afí que seria responsable de l'efecte inhibitor observat.

#### 5.1. El pèptid C18 de les RCAN podria ser un inhibidor no competitiu de Cn

Alguns autors han demostrat que tant la proteïna RCAN1 sencera com el seu extrem C-terminal inhibeixen la desfosforilació del fosfopèptid RII per part de Cn, suggerint que RCAN1 inhibiria la desfosforilació de tots els substrats de Cn (Ryeom et al., 2003). Seguint amb aquesta mateixa hipòtesi, els mateixos autors van demostrar que l'exó 7 de RCAN1 interacciona amb Cn a través del centre actiu, donat que inhibeix la desfosforilació del substrat cromogènic pNPP per part de Cn (Chan et al., 2005). Aquestes dades suggereixen que

l'exó 7 de RCAN1 actuaria com a inhibidor competitiu de l'activitat fosfatasa de Cn envers els substrats RII i pNPP, respectivament. Contràriament, els resultats detallats anteriorment a l'apartat 4.2.2.2 així com el fet de que el pèptid C18 de RCAN1 no inhibeix la desfosforilació de RII per part de Cn *in vitro* (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda), apunten a que els pèptids C18 de les RCAN podrien no interaccionar amb Cn a través del centre actiu.

Possiblement, el fet de que Chan i col. utilitzin fragments de RCAN1 més grans que nosaltres, que hem emprat pèptids de 21 aminoàcids, pugui justificar en part que els nostres resultats no coincideixin (Chan et al., 2005; Ryeom et al., 2003). Les nostres dades apunten a que la interacció dels pèptids C18 de les RCAN tindria lloc fora del centre actiu, però no descarten certa proximitat amb ell, ja que els pèptids LxVP dels NFAT, que sí que inhibeixen la desfosforilació del pèptid RII per part de Cn, no competeixen les interaccions C18-RCAN1-Cn i C18-RCAN3-Cn, encara que a altes concentracions s'observi un cert efecte (Apartat Resultats, Figura 28). Podria ser que la regió de RCAN1 emprada en els treballs anteriors produís una interferència en la desfosforilació dels substrats pNPP i RII per part de Cn o bé que els diferents resultats obtinguts puguin ser deguts als diferents procediments comercials emprats en la mesura de l'activitat fosfatasa. Nosaltres en les nostres condicions i emprant pèptids com a controls, no fàrmacs, hem valorat l'efecte del pèptid C18 de les RCAN en l'activitat fosfatasa de Cn i aquest no inhibeix clarament la seva activitat vers el fosfopèptid RII (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). El fet de que els pèptids C18 de les RCAN puguin ser inhibidors no competitius de Cn suggereix que podrien inhibir més selectivament la desfosforilació de NFAT sense afectar a la resta de substrats de Cn.

## 5.2. Efecte immunosupressor del motiu CIC de les RCAN a limfòcits T humans

Els assaigs funcionals realitzats amb les proteïnes RCAN (Apartat Resultats, Articles 1 i 2), van ser realitzats abans d'identificar que el pèptid C18 és la regió mínima d'inhibició de la via de senyalització Cn-NFAT *in vivo*. Aquesta és la raó principal per la qual determinats assaigs funcionals van ser realitzats amb el motiu CIC enlloc de amb el C18.

Els nostres resultats demostren que la inhibició de Cn per part del motiu CIC de les RCAN promou una disminució marcada de l'expressió gènica de diverses citoquines en cèl·lules Jurkat, encara que tant en RCAN1 com en RCAN3 la proteïna sencera inhibeix més l'expressió gènica que els respectius motius CIC (Article 1, Figura 4A i Article 2, Figura 4B). Aquest anàlisi es va dur a terme emprant targetes Micro Fluídiques on es va analitzar l'expressió d'un ampli ventall de gens: citoquines de limfòcits Th1 i Th2, factors de transcripció i de *splicing*, quinases, fosfatases i ribonucleoproteïnes nuclears, la majoria d'ells implicats en el desenvolupament de la resposta immune. Aquests assaigs van requerir la transfecció de les cèl·lules amb les diferents construccions de les RCAN fusionades a EGFP. Donada la dificultat de transfectar cultius de limfòcits T primaris, es va triar la línia cel·lular

de limfòcits T Jurkat per poder realitzar els experiments, però aquest fet, ens va limitar en part l'avaluació del paper de les RCAN a limfòcits T humans. Aquesta línia cel·lular està classificada com de tipus Th1, tot i que també pot expressar algunes citoquines característiques de Th2 com ara la *IL13*, en presència de ionomicina i PMA (Aramburu et al., 1999) i la *IL4*, com a resultat de la sobreexpressió exògena del factor de transcripció C-MAF (Ho et al., 1998). Per aquest motiu, tot i que les targetes contenen les sondes que permetien la detecció de la *IL4*, *IL5*, *IL6* i *IL10*, totes citoquines característiques de limfòcits Th2, no es va poder avaluar la modulació de la seva transcripció donat que en Jurkat no s'expressen. Seria interessant determinar en un futur la implicació de les RCAN en l'expressió gènica de les citoquines característiques de Th2, a ser possible en cultius primaris de cèl·lules T.

L'elecció de les diverses citoquines a analitzar es va fer tenint en compte en part els resultats publicats prèviament per Aramburu i col. (Aramburu et al., 1999). Aquests autors, van realitzar assaigs de protecció a la RNAsa i van demostrar que el pèptid VIVIT inhibia específicament la transcripció de citoquines dependents de NFAT. En canvi, no inhibia la transcripció ni de *LTA* (per *lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)*) ni de *LTB* (per *lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)*), ambdues citoquines presumiblement dependents de Cn, donat que la seva expressió és inhibida amb CsA, però independents de NFAT (Aramburu et al., 1999). Els nostres resultats mostren que el motiu CIC de les RCAN inhibeix l'expressió gènica de diverses citoquines dependents de NFAT (Article 1, Figura 4 i Article 2, Figura 4B). En canvi, l'expressió de *LTA* no va resultar significativament augmentada ni disminuïda per ionomicina+PMA o CsA, respectivament, mentre que la de *LTB* augmentava moderadament en presència de ionomicina+PMA i dramàticament en presència de CsA. Aquests resultats inesperats en els controls de la *LTA* i de la *LTB* no es corresponen amb els obtinguts per Aramburu i col., tot i que podrien ser resultat de la sensibilitat de la diferent metodologia emprada. En aquest sentit, cal dir que la tècnica de PCR a temps real és molt sensible i l'anàlisi per targetes Micro Fluídiques es fa de forma totalment automatitzada. En el context dels nostres resultats obtinguts amb els controls de la *LTA* i la *LTB*, l'any 2002 Kuprash i col. van demostrar que a PBMC (per *peripheral blood mononuclear cells*) la CsA bloqueja l'expressió de la *LTA* però no la de la *LTB* (Kuprash et al., 2002). A més, recentment s'ha demostrat que a la línia de cèl·lules T murina Cl.7W2T el nivell d'expressió de *LTA* no depèn de Cn (Roehrl et al., 2004) i a la línia cel·lular D5 murina la transcripció de *LTB* tampoc (Kang et al., 2005b). En conjunt, aquestes dades suggereixen que el patró d'expressió de *LTA* i *LTB* pot dependre del tipus cel·lular emprat i de les condicions experimentals. En el nostre cas, vam utilitzar cèl·lules Jurkat clon E6-1 que coincideix amb el model emprat per Aramburu i col. (Aramburu et al., 1999). Es conegut el fet que diferents subclons o inclús dins del mateix clon en línies cel·lulars poden detectar-se diferents comportaments per causa de la inestabilitat genètica, extremadament alta concretament en la línia cel·lular Jurkat.

Així doncs, a partir de les dades obtingudes amb les targetes Micro Fluídiques no podem descartar que el motiu CIC també inhibeixi la transcripció dependent d'altres factors de transcripció, com per exemple NF $\kappa$ B, entre d'altres. En aquest context, altres assaigs

realitzats amb la proteïna sencera RCAN3 que inclou el motiu CIC però no el motiu consens PxlxxT de les RCAN, indiquen que RCAN3 inhibiria selectivament la transcripció del gen de la luciferasa quan aquest es troba sota el control d'un promotor que conté llocs d'unió a NFAT (Article 2, Figura 4A). A més, el fet de que ni el pèptid RII ni els complexos fàrmac-immunofilina competeixin les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN amb Cn, tal i com s'ha descrit anteriorment, recolzarien la hipòtesi de que l'efecte inhibidor dels pèptids C18 podria ser específic de la interacció Cn-NFAT mentre que la desfosforilació de la resta de substrats de Cn no resultaria afectada.

### 5.3. Patró diferencial de les RCAN en la inhibició de la transcripció dels gens de citoquines dependents dels NFAT

El patró d'inhibició de l'expressió gènica de citoquines per part de RCAN1-1 i RCAN3-2, tot i que en general és bastant similar, mostra subtils diferències.

Pel que fa a la potència de la inhibició de l'expressió gènica de les citoquines, en el cas de RCAN1-1, tant amb la proteïna sencera com amb el fragment RCAN1-1(2-218) s'aconsegueix abolir completament l'expressió de les citoquines, d'igual manera que passa quan les cèl·lules s'estimulen en presència de CsA. En canvi, la proteïna sencera RCAN3-2 produeix una inhibició marcada de l'expressió gènica però no s'aconsegueixen els nivells d'inhibició promoguts per RCAN1-1, essent els nivells d'expressió del 12-25% (Figura 4, Article 1 i Figura 4B, Article 2). S'ha observat en diverses ocasions que el nivell d'expressió de la proteïna RCAN3-2 transfectada és menor que l'observat amb RCAN1-1 (dades no mostrades). Aquest diferent nivell d'expressió de les dues RCAN podria justificar que RCAN3-2 no promogui una inhibició total de l'expressió gènica de les citoquines mentre que RCAN1-1 sí ho faci.

Un altre aspecte diferencial entre la inhibició de citoquines promoguda per RCAN1-1 i RCAN3-2 podria ser degut a l'existència de diferent nombre d'elements de resposta a NFAT i a AP1 en les regions promotores de les citoquines analitzades, així com de si aquests són funcionals o no. En aquest context, l'anàlisi bioinformàtica d'una seqüència conservada en la regió 5' a 2 kb de l'inici de transcripció de *CSF2* ha predit l'existència de set llocs d'unió a NFAT (Hogan et al., 2003). Tot i que la funcionalitat d'aquests llocs d'unió no està confirmada experimentalment, la menor expressió a nivell de proteïna de RCAN3-2 podria justificar parcialment que l'expressió gènica de *CSF2* pogués ser inhibida per RCAN1-1 en diferent mesura que per RCAN3-2.

Tot i que la interacció de RCAN1-Cn ha estat la més estudiada fins al moment, se sap que RCAN1 interacciona amb altres proteïnes que podrien modular el seu efecte inhibidor vers la via de senyalització Cn-NFAT. A més, també s'hauria de considerar que RCAN1 i RCAN3 podrien participar en diferents vies de síntesis de citoquines a part de la via de senyalització Cn-NFAT. Els promotors d'algunes citoquines com *IL2*, *IL4* i *IFNG*, també contenen llocs d'unió d'altres factors de transcripció, com ara MEF2D i DREAM (per *downstream regulatory element*

*antagonist modulator*), els quals en condicions de no estimulació actuen com a repressors de l'expressió gènica d'aquestes citoquines (Savignac et al., 2007). Per tant, l'expressió gènica de les citoquines no depèn única i exclusivament de la cooperació NFAT:AP1 sinó de molts més factors de transcripció. Potser la regulació d'altres vies de senyalització per part de determinades RCAN que poguessin afectar als factors de transcripció MEF2 i DREAM podria justificar el diferent patró d'expressió de citoquines detectat. Per últim, també cal recordar que el propi NFAT pot establir complexos cooperatius amb altres factors de transcripció diferents d'AP-1, com OCT i GATA3 entre d'altres, i afegir un nivell més de regulació en l'expressió gènica de les citoquines.

#### 5.4. Paper dual de les RCAN *in vivo*

Darrerament, alguns fenotips observats analitzant els ortòlegs de RCAN1 a *C. neoformans* (Fox and Heitman, 2005) i *S. Cerevisiae* (Hilioti et al., 2004) o emprant models murins deficientes en *Rcan1* (Vega et al., 2003) o ratolins deficientes en *Rcan1* o *Rcan2*, respectivament així com amb en el doble mutant per *Rcan1* i *Rcan2* (Sanna et al., 2006) mostren similitud amb els fenotips de models deficientes en CnB. Aquestes dades han canviat el concepte funcional de les RCAN passant de ser considerades únicament com inhibidors de Cn a també facilitadores de l'activitat fosfatasa de Cn. S'ha demostrat que a llevat, la fosforilació per part de la GSK-3 de RCN1 promou l'activació de Cn (Hilioti et al., 2004), i resultats semblants s'han obtingut a fongs (Fox and Heitman, 2005) i també a mamífers (Abbasi et al., 2006). Alguns autors han proposat un possible paper de RCAN1 fosforilat com a chaperona que facilitaria l'activació de Cn. Així doncs, tant l'estat de fosforilació de les RCAN com el seu nivell d'expressió modularien el paper funcional de les RCAN *in vivo*. Malgrat aquests resultats alguns models murins deficientes en *Rcan1* han mostrat un fenotip que correlacionaria amb el paper inhibidor de RCAN1 (Ryeom et al., 2003) i no amb el nou paper proposat de facilitador (Vega et al., 2003).

Els nostres resultats experimentals correlacionen amb el paper inhibidor descrit per les RCAN en condicions de sobreexpressió cel·lular però no s'ha estudiat l'efecte de les RCAN a nivell endogen.

A més d'aquest nou paper de facilitador de les RCAN a nivell endogen, la generació de model murins deficientes en *Rcan1* o *Rcan2* o en ambdues proteïnes alhora han mostrat que segons el teixit i el procés biològic estudiat podrien existir fenòmens de redundància funcional (Sanna et al., 2006). Ryeom i col. havien descrit prèviament que el dèficit de *Rcan1* no afecta de manera dramàtica als limfòcits T ni als B, però en canvi, sí incrementa significativament l'apoptosi en cèl·lules T (Ryeom et al., 2003). La generació del mutant amb deleció de *Rcan2* mostra nivells similars d'apoptosi, mentre que el doble mutant amb ambdós gens delecionats presenta el doble de cèl·lules T apoptòtiques que els mutants individuals (Sanna et al., 2006). Aquestes dades suggereixen que la falta de *Rcan1* o *Rcan2* pot ser compensada per l'existència dels altres membres de la família i justificaria en part els



fenotips suaus observats en els mutants individuals (Ryeom et al., 2003). En canvi, la deleció de dos membres simultàniament comportaria l'aparició d'un fenotip més sever (Sanna et al., 2006). Per altra banda, és lògic pensar que tot i que puguin ser parcialment redundants les seves funcions, donada l'alta conservació aminoacídica que tenen els membres de la família en vertebrats, l'existència de tres proteïnes podria implicar la participació de determinades RCAN en algunes funcions específiques, de tal manera que l'efecte de la deleció d'algun membre en un determinat context podria ser més marcada. Els mateixos fenòmens s'han descrit en els ratolins deficientes en els diferents membres de la família dels NFAT: deleccions individuals comporten l'aparició de fenotips suaus mentre que la generació de mutants dobles dona lloc a fenotips severs (Apartat Introducció, Taula 1).

### 5.5. L'efecte inhibidor de les RCAN és més específic que el de CsA i FK506

El treball realitzat en aquesta Tesi ha permès establir l'efecte immunosupressor del motiu CIC de les RCAN vers la via de senyalització Cn-NFAT a limfòcits T humans.

Aquest fet suposa la identificació d'una nova eina immunosupressora que podria afegir-se a l'ampli ventall de fàrmacs existents en l'actualitat emprats en la teràpia del trasplantament i en el tractament de malalties autoimmunes. Els protocols terapèutics actuals solen incloure l'administració d'un fàrmac inhibidor de Cn, CsA o FK506, degut a que inhibeixen potentment la seva activitat fosfatasa. Malauradament, aquests fàrmacs promouen l'aparició de severs efectes secundaris com nefrotoxicitat, neurotoxicitat, nefropatia crònica del trasplantament i risc augmentat de càncer, entre d'altres. El diferent mecanisme d'acció de les RCAN en comparació amb el de la CsA o el FK506 podria disminuir significativament alguns d'aquests greus efectes secundaris.

Per una banda, la interacció de les RCAN i Cn és directa, mentre que CsA i FK506 requereixen la participació de les immunofilines. Això provoca que resultin afectades de manera indirecta altres processos biològics en els que participen aquestes immunofilines, com són la permeabilitat mitocondrial i la funció dels receptors RyR (per *ryanodine receptors*), entre d'altres (Bandyopadhyay et al., 2000; Molkentin, 2001). A més, cal dir que les immunofilines no només són requerides pels inhibidors de Cn, sino que els inhibidors de la proteïna mTOR, rapamicina i everolimus, també necessiten la participació de la FKBP12 per realitzar el seu efecte immunosupressor (Sabatini et al., 1994). També s'ha descrit que part dels efectes secundaris de CsA i FK506 són deguts a que aquests fàrmacs indueixen l'expressió de TGFB1 (Khanna et al., 1997) i l'efecte d'aquesta citoquina s'ha relacionat amb el desenvolupament de diversos efectes secundaris com nefrotoxicitat, hipertensió, fibrosis i invasió tumoral (Border et al., 1995; Hojo et al., 1999). A més, mitjançant assaigs de determinació de l'activitat fosfatasa de Cn *in vitro* s'ha pogut demostrar que la CsA té una IC<sub>50</sub> dins del rang nanomolar baix mentre que el FK506 és encara més afí per Cn (Fruman et al., 1992). Per altra banda, els nostres resultats han mostrat que la IC<sub>50</sub> dels pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 està dins el rang micromolar baix. Aquesta dada indica que els pèptids

C18 de les RCAN són significativament menys afins que CsA i FK506 per Cn, i això podria comportar cert avantatge davant l'ús d'aquests fàrmacs, ja que part dels efectes secundaris que apareixen per l'administració de CsA i FK506 tenen relació amb el seu alt potencial immunosupressor, en combinació amb el fet de que Cn sigui un enzim d'expressió ubíqua. Finalment, tant CsA com FK506 bloquegen la desfosforilació de tots els substrats de Cn, mentre que els resultats obtinguts amb els pèptids C18 de les RCAN *in vitro* semblen indicar que podrien inhibir específicament la desfosforilació dels NFAT sense afectar la dels altres substrats, tot i que aquest punt requeriria un anàlisi experimental *in vivo* més exhaustiu.

#### **5.6. Els pèptids C18 de les RCAN podrien ser una nova eina immunosupressora *in vivo***

Un cop identificat l'efecte funcional inhibidor en cèl·lules eucariotes del pèptid C18 de les RCAN vers la via de senyalització Cn-NFAT es va voler avaluar el seu paper immunosupressor en models murins de trasplantament. Com a pas previ a la realització d'aquests assaigs es va analitzar la capacitat de transducció dels pèptids C18 de les RCAN en cèl·lules eucariotes. Per fer això es van encapsular el pèptid C18-RCAN3 marcat amb fluoresceïna en liposomes per promoure la seva endocitosis. Els resultats obtinguts mostren que el pèptid és internalitzat significativament però en les condicions assajades no va resultar funcional (dades no mostrades). Aquest fet suggereix que possiblement el pèptid no és alliberat de les vesícules endocítiques i per això no inhibiria la translocació nuclear de NFAT. Així doncs, no s'han pogut emprar els pèptids C18 de les RCAN en cap model murí de trasplantament que ens hagués permès avaluar la seva eficàcia immunosupressora *in vivo*, d'igual manera a com s'ha publicat prèviament pel pèptid VIVIT fusionat a un PTD (per *protein transduction domain*) format per 11 arginines (Noguchi et al., 2004).

Tot i això, actualment existeixen estratègies alternatives que permeten l'internalització de pèptids. Alguns autors han demostrat que la fusió de les seqüències TAT o *penetratin* a l'extrem N-terminal d'alguns peptoides afavoreix la seva internalització (Orzaez et al., 2007); recentment també s'ha demostrat que la fusió del polímer PGA (per *poly-L-glutamic acid*) a la molècula que es desitja internalitzar incrementa la seva solubilitat (Vicent and Perez-Paya, 2006); per últim, la síntesi de pèptids incorporant enllaços sensibles al pH intracel·lular en determinades posicions afavoreix l'alliberament dels pèptids des de les vesícules endocítiques al citoplasma i promou la seva correcta funcionalitat (Gump and Dowdy, 2007).

## **6. CONSERVACIÓ A L'ESCALA EVOLUTIVA DELS MOTIUS DE LES RCAN CARACTERITZATS FINS AL MOMENT**

Aquest treball experimental ha permès caracteritzar de forma més precisa l'estructura de les proteïnes RCAN humanes i demostrar que a més del motiu FLISPP,



existeixen altres dos motius, el motiu CIC i el motiu consens PxlxxT, a través del qual les RCAN interaccionen amb Cn, encara que l'únic responsable d'inhibir la via de senyalització Cn-NFAT, és el motiu CIC (Article 2, Annex IV, Figura 21).

L'anàlisi de genòmica comparada de tots els membres de la família de proteïnes RCAN, realitzada per la Dra. Àgatha Schlüter (CGMM-IDIBELL), ha revelat que existeixen membres distribuïts a tota l'*Eukarya* i que l'únic motiu dels tres identificats fins al moment, que tenen conservat tota la família de les RCAN, és el motiu FLISPP (Article 2, Figura 1). En canvi, el motiu CIC i el motiu consens PxlxxT estan restringits a les proteïnes RCAN de vertebrats. La conservació de motius entre proteïnes habitualment comporta també la conservació dels seus efectes funcionals. De fet, l'anàlisi de genòmica comparada de les seqüències de les proteïnes RCAN a vertebrats ha revelat que, a més de la conservació d'aquest dos motius, les seves regions central i C-terminal estan altament conservades (Article 2, Figura Suplementària). Aquestes dades han permès postular que les RCAN a vertebrats constituïrien una nova subfamília estretament relacionada des d'un punt de vista funcional. A més, mentre que en els vertebrats existeixen tres proteïnes, RCAN1, RCAN2 i RCAN3, la resta de membres de la família únicament tenen una proteïna RCAN (Article 2, Figura 1). Curiosament, la família de factors de transcripció NFAT només està present a vertebrats. De fet alguns autors han proposat que els NFATc1-c4 haurien aparegut com a resultat de la recombinació d'un exó 1 que contindria el domini NHR, i el domini RHR present a la proteïna TonBP dels invertebrats (que és el NFAT5 de vertebrats) (Wu et al., 2007b). Per altra banda cal destacar que l'entrada de  $Ca^{2+}$ , la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -CaM-Cn i les quinases que fosforilen els NFAT, estan conservades a tota l'*Eukarya* (Gwack et al., 2006). És lògic pensar des d'un punt de vista evolutiu que l'aparició dels NFAT, els quals participen en moltes vies de senyalització cel·lular com a substrats de Cn també va anar acompanyat del desenvolupament d'una bateria de proteïnes reguladores d'aquesta activitat, entre elles les RCAN.

## 7. CERCA DE MOLÈCULES DISRUPTORES DE LA INTERACCIÓ C18-RCAN1-Cn

El treball realitzat en aquesta Tesi ha permès caracteritzar les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN amb Cn *in vitro* i també dissenyar i optimitzar un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció C18-RCAN1-Cn que pot ser emprat com una nova eina en la cerca de fàrmacs amb potencial immunosupressor. El cribratge realitzat emprant diferents quimioteques ha permès identificar alguns *hits* candidats, encara que únicament l'efecte funcional del producte IDI3A ha estat avaluat *in vivo*.

### 7.1. Les quimioteques de peptoides no han permès identificar cap *hit* candidat

El cribratge de quimioteques combinatòries i, més concretament, de mesclades controlades, és un bon sistema per identificar composts actius vers una diana biològica

d'interès. La validesa de les quimiotèques de trímers i pentàmers de peptoides emprades està avalada per diversos treballs publicats en els darrers anys. La utilització de la quimioteca de trímers ha permès identificar dos peptoides que neutralitzen les endotoxines bacterianes i el seu efecte *in vivo* s'ha confirmat emprant models murins als quals se'ls havia inoculat lipopolisacàrid (Mora et al., 2005). A partir d'aquesta mateixa quimioteca de trímers també es va identificar un peptoid capaç d'unir-se a APAF1 (per *apoptotic peptidase activating factor 1*) i inhibir l'apoptosi (Malet et al., 2006). Per altre banda, l'ús de la quimioteca de pentàmers també ha permès identificar diversos peptoides amb potencial terapèutic però aquests resultats estan pendents de publicació per altres grups. En el nostre cas, amb aquestes quimiotèques no es va identificar cap mescla amb capacitat disruptora de la interacció.

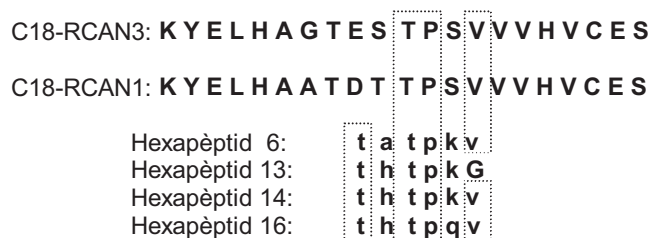
El fet de que el pèptid C18-RCAN1 tingui una marcada afinitat per Cn podria explicar perquè no s'han identificat peptoides que disruptin aquesta interacció, ja que únicament aquelles molècules que siguin altament afins i capaces de disruptar notablement la interacció en estudi podran ser identificades. No s'hauria de descartar tampoc que aquesta interacció pugui implicar diversos residus que puguin trobar-se en la seqüència del pèptid C18. En el cas de la cerca de disruptors de la interacció VIVIT-Cn, possiblement l'alta afinitat d'aquesta interacció també ha dificultat la identificació de *hits* candidats.

## 7.2. Quimioteca d'hexapèptids de D-aminoàcids

### 7.2.1. Els residus TPxV de RCAN1 podrien participar en la interacció amb Cn

El cribratge de la interacció C18-RCAN1-Cn amb la quimioteca d'hexapèptids de D-aminoàcids, tot i que va generar resultats discrets, va permetre deconvolucionar les dades i sintetitzar 16 hexapèptids de seqüència definida (Apartat Materials i Mètodes, Taula 11). L'assaig d'aquests 16 pèptids va portar a la identificació de quatre pèptids disruptors de la interacció C18-RCAN1-Cn amb un desplaçament de la interacció del 40%. Aquests hexapèptids de D-aminoàcids van ser els números 6, 13, 14 i 16 (Figura 45).

Curiosament, l'alineament de les seqüències d'aquests quatre hexapèptids amb la dels pèptids C18-RCAN1 i C18-RCAN3 va mostrar la conservació de tres residus, una treonina, una prolina i una valina, en tots els pèptids considerats excepte en el número 13 que presenta una glicina enlloc de la valina. Aquests resultats suggeririen l'existència d'un nou motiu en les RCAN, al que hem anomenat TPxV.



**Figura 45.** Alineament de les seqüències dels pèptids C18 de les RCAN i dels quatre hexapèptids de D-aminoàcids seleccionats. En els requadres s'indiquen els aminoàcids conservats.

El fet de que aquest cribratge hagi seleccionat preferentment aquests quatre hexapèptids de D-aminoàcids d'un total de  $2.5 \times 10^6$  combinacions possibles i a més, que les quatre seqüències presentin el motiu TPxV, suggereix que aquests residus podrien participar físicament en la interacció amb CnA $\alpha$ . De fet, el que sembla que estigui passant és que els pèptids seleccionats mimetitzen part de la seqüència responsable de la interacció dels C18 de les RCAN amb Cn.

Tot i que l'alineament de la Figura 45 mostra la conservació del motiu TPxV entre els diferents pèptids considerats, cal tenir en compte que s'estan comparant pèptids formats per L-aminoàcids respecte d'altres formats per D-aminoàcids. Se sap que la diferent orientació espacial de les cadenes laterals dels dos tipus d'aminoàcids pot afectar a l'estructura conformacional dels pèptids. Tot i això, el fet de que es tracti de pèptids formats solament per sis residus ens permet suggerir que possiblement no estiguin massa estructurats i en aquest cas l'efecte de l'orientació espacial de les cadenes laterals no sigui tant crític. A més, l'anàlisi de la presència d'aquest motiu TPxV en altres proteïnes emprant l'eina ScanProsite disponible a la pàgina web <http://www.expasy.ch> ha mostrat que aquest motiu està present en les proteïnes AKAP11 i AKAP6 (per *A-kinase anchor proteins*), que pertanyen a la mateixa família que l'inhibidor de Cn AKAP79, i en la proteïna amfifisina I, substrat prèviament ja descrit de Cn (Bauerfeind et al., 1997). Aquestes dades apunten a que aquest motiu podria participar en la unió de diversos tipus de proteïnes, substrats o proteïnes adaptadores, en Cn.

El desplaçament que els quatre hexapèptids de D-aminoàcids promouen vers la interacció C18-RCAN1-Cn és d'aproximadament un 40% (Apartat Resultats, Figura 34). Això suggereix que, possiblement a part dels residus del motiu TPxV, altres residus continguts dins la seqüència del pèptid C18 de les RCAN podrien estar implicats en la interacció d'aquest pèptid amb Cn. En concordança amb aquesta dada, es van realitzar mutants dobles (TP, TS i HT) i triples (ELH i KYE) de la seqüència del pèptid ELHA a alanina (dades no mostrades, experiments realitzats per Anna Aubareda). Cal recordar que el pèptid ELHA (RCAN1-1(198-210)) té 13 aminoàcids de longitud i està inclòs dins la seqüència del pèptid C18. Mitjançant assaigs *pull down* es va avaluar la capacitat d'interacció d'aquests mutants amb Cn. Cap dels mutants dobles analitzats va perdre la capacitat d'interaccionar amb Cn mentre que els dos mutants triples sí que van deixar d'interaccionar amb Cn. La capacitat disruptora reduïda dels hexapèptids de D-aminoàcids podria estar en concordança amb els resultats obtinguts per *pull down* suggerint la participació de diversos residus dels pèptid C18-RCAN1 en la interacció amb Cn. Així i tot, no s'hauria de descartar que el canvi de tres aminoàcids consecutius, en els mutants triples, pugui alterar el correcte plegament del pèptid ELHA, que només comprèn 13 aminoàcids, i per aquest motiu no interaccionarien amb Cn. Alternativament, potser algun

d'aquest aminoàcids mutats, en els mutants triples, podria participar directament en la interacció amb Cn. Totes aquestes possibilitats encara estan pendents de ser analitzades.

La caracterització del desplaçament que promouen els quatre hexapèptids de D-aminoàcids vers la interacció C18-RCAN1-Cn s'ha fet *in vitro* mitjançant anisotropia de fluorescència, així que resta encara avaluar el seu efecte inhibitor *in vivo*.

L'estratègia seguida en tot moment per cercar inhibidors de la via de senyalització Cn-NFAT no s'ha centrat en la disrupció directa d'aquesta interacció, sinó en la disrupció indirecta, tenint en compte l'efecte inhibitor de les RCAN vers la interacció NFAT-Cn demostrat *in vivo* (Article 1 i 2, Figura 3 i Figura 4). El pèptid 14 desplaça la interacció C18-RCAN1-Cn un 40% i sabem que la  $K_d$  d'aquesta interacció és de  $1.25 \mu\text{M}$  mentre que la de SPRIET-Cn és  $6.25 \mu\text{M}$ . Encara que aquests dos pèptids, C18 i SPRIET, pertanyin a proteïnes diferents, RCAN i NFAT respectivament, els assaigs de competició creuada realitzats amb ells suggereixen certa proximitat estèrica i/o superposició en les seves regions d'interacció amb CnA $\alpha$  (Apartat Resultats, Figura 28). A més, s'ha demostrat que els motius CIC de RCAN1 i RCAN3 inhibeixen la translocació nuclear de NFATc2, que solament conté el motiu PxIxxT funcional (Article 1 i 2, Figura 3). Totes aquestes dades suggereixen que aquests hexapèptids de D-aminoàcids podrien tenir un efecte disruptor més potent vers la interacció NFAT-Cn *in vivo* que vers la interacció RCAN-CnA, encara que això caldria demostrar-ho amb altres aproximacions experimentals.

### 7.3. Quimiotèques de composts sols

La utilització de mescles de peptoides o pèptids, és útil per cribrar un alt nombre de molècules en poc temps, però limita la identificació de *hits* candidats a aquells que realment són disruptors molt eficaços de la interacció en estudi i poden sobresortir de manera significativa tot i estar presents en una barreja de molècules. Donat que la interacció C18-RCAN1-CnA presenta una elevada afinitat i no vam obtenir cap *hit* candidat amb les aproximacions de cribratge emprant mescles es va canviar l'estratègia i es van cribrar quimiotèques de composts definits, malgrat que això suposava analitzar un nombre de composts reduït. A més de tenir en compte la mida de les molècules disruptores, també vam considerar que podia ser important per desplaçar les interaccions en estudi la càrrega de les mateixes.

Inicialment, es va cribrar una petita col·lecció formada per només onze productes heterocíclics de sals de tetraalquilamoni amb càrrega positiva que tenen una massa molecular de 450 Da, però cap va desplaçar significativament la interacció C18-RCAN1-Cn (Apartat Resultats, Figura 35). Recentment, s'ha demostrat que la utilització d'aquest tipus de molècules pot conduir a la identificació de *hits* que disruptin específicament la via de senyalització Cn-NFAT *in vivo* (Sieber et al., 2007).

### 7.3.1. El producte IDI3A

La segona quimioteca cribrada va estar formada per una col·lecció de molècules disponibles al Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) i al Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). D'entre elles, el producte anomenat IDI3A va semblar un candidat interessant a partir dels resultats obtinguts *in vitro* en els estudis de dosi-resposta efectuats (Apartat Resultats, Figura 35 i 36). Aquest producte s'ha anomenat amb un codi donat que és un fàrmac que s'utilitza en l'actualitat en el tractament d'altres malalties i s'està analitzant la possibilitat de la seva utilització en el camp de la teràpia del trasplantament.

Aquest producte és fluorescent i el seu espectre de fluorescència es superposa parcialment amb el de la carboxifluoresceïna (CF) emprada en el marcatge dels pèptids utilitzats. Descartar els productes fluorescents sol ser una pràctica habitual en la realització de cribratges a gran escala, degut als múltiples problemes que pot comportar treballar amb ells, entre ells, el de l'obtenció de falsos positius. En el nostre cas, degut al nombre limitat de *hits* candidats identificats es va decidir continuar amb la seva caracterització *in vivo*. Els altres *hits* candidats van haver de ser descartats bàsicament per raons de citotoxicitat severa que haguessin fet impossible emprar-los en assaigs *in vivo*.

Els experiments *in vivo* van demostrar que el producte IDI3A inhibeix la via de senyalització cel·lular Cn-NFAT a concentracions altes (Apartat Resultats, Figura 37, 38 i 39). A més d'aquests resultats experimentals, hi ha dues dades que confirmen que l'efecte inhibitor observat pot ser interessant:

1.- A la literatura existeixen dues publicacions en les quals es mostra que el producte IDI3A inhibeix l'expressió de citoquines proinflamatòries. En el primer, el producte IDI3A en combinació amb corticoides disminueix l'expressió de TNF en PBL. En aquest sentit, els nostres resultats, obtinguts mitjançant RT-PCR semiquantitativa, mostren que l'expressió gènica de *TNF* va ser inhibida de forma més significativa pel producte IDI3A. A més, les nostres dades també mostren l'efecte inhibitor del producte sobre l'expressió gènica de *CSF2* i *IL3* (Apartat Resultats, Figura 39). En el segon, el producte IDI3A inhibeix parcialment la translocació nuclear i transcripció de diverses citoquines proinflamatòries dependents de NF $\kappa$ B a monòcits.

2.- Per altra banda, la consulta a la "Oficina Española de Patentes y Marcas" a través de l'adreça electrònica <http://es.espacenet.com> va mostrar que existeix una patent datada a l'octubre del 2006, que fa referència al primer article comentat anteriorment. Molt recentment, al setembre del 2007,, ha aparegut una altra patent en la qual es descriu també l'ús del producte IDI3A en combinació amb altres fàrmacs pel tractament de desordres múscul-esquelètics que evolucionen amb episodis inflamatoris.

Les nostres dades experimentals (Apartat Resultats, Figures 37, 38 i 39) constitueixen la primera evidència experimental de la inhibició de la via de senyalització Cn-NFAT per part del producte IDI3A i estan en concordança amb les publicacions i patents aparegudes

darrerament. Per aquest motiu, no s'hauria de descartar l'ús del producte IDI3A com a complement a altres fàrmacs immunosupressors en la teràpia del trasplantament.

Per altra banda, el producte IDI3A podria ser útil per realitzar estudis de *docking* virtual que permetrien dissenyar molècules estructuralment similars però més potents que ell, que podrien ser assajades com a possibles disruptors de la via Cn-NFAT. La resolució de l'estructura IDI3A-Cn per cristal·lització o RMN confirmaria de manera definitiva si la diana del producte IDI3A és Cn i revelaria el lloc exacte d'interacció del producte en Cn.

## 8. CERCA DE DISRUPTORS MITJANÇANT ANISOTROPIA DE FLUORESCÈNCIA

En els darrers anys, s'ha descrit la identificació de molècules disruptores de la interacció VIVIT-Cn mitjançant anisotropia de fluorescència. Aquestes molècules, anomenades INCA, són quinones altament citotòxiques per la cèl·lula (Kang et al., 2005a; Roehrl et al., 2004). Tant VIVIT com C18-RCAN1 presenten una afinitat similar per Cn. El fet de que aquesta sigui elevada ha dificultat significativament la identificació de *hits* candidats disruptors. Tot i que els *hits* inicials identificats com a disruptors de la via Cn-NFAT siguin citotòxics, com és el cas dels INCA, això no ha de suposar un inconvenient insalvable. De fet, és habitual que calguin modificacions químiques de les estructures identificades originalment per tal d'incrementar o disminuir diferents característiques de l'estructura original, com ara la solubilitat o la citotoxicitat. Alternativament, una altra estratègia consisteix en emprar la molècula inicial per fer una cerca virtual d'altres molècules que tinguin l'estructura relativament similar a la del *hit* i avaluar la seva capacitat d'interacció amb la diana desitjada així com la seva citotoxicitat.

Alternativament a l'ús de la interacció C18-RCAN1-Cn, s'haurien pogut realitzar els cribratges amb la interacció SPRIET-Cn, donat que la seva afinitat és menor que la de qualsevol altre de les interaccions caracteritzades i a més, la identificació de molècules que desplaressin aquesta interacció afectarien directament la via de senyalització Cn-NFAT. Nosaltres en col·laboració amb els grups del CIPF i del CSIC, vam preferir utilitzar la interacció C18-RCAN1-Cn per tractar-se d'una interacció nova i constituir una manera indirecta d'afectar a la via de senyalització Cn-NFAT. Pel que fa al tipus d'assaig emprat, és convenient no tenir una interacció massa afí per tal de facilitar la cerca de molècules disruptores candidates. En aquest sentit, no s'hauria de descartar disminuir la mida del pèptid C18 de les RCAN del 21 residus actuals a 6 o 8 residus. Teòricament, aquesta estratègia generaria pèptids menys afins per Cn, però a la vegada, com a conseqüència, la seva interacció amb Cn seria més fàcil de desplaçar.

La resolució de les estructures tridimensionals RCAN1-Cn i RCAN3-Cn seria la manera definitiva d'identificar els residus essencials que participen en aquestes interaccions i determinar la diferència entre les regions de Cn amb les quals les RCAN i els NFAT interaccionen. Alguns autors han intentat abordar aquest projecte mitjançant la cristal·lització de la interacció RCAN1-Cn però sense èxit (Chan et al., 2005). La dificultat

segons ells ha recaigut en el fet de que van emprar la proteïna RCAN1 sencera, i que aquesta és altament susceptible a patir proteòlisi pels seus extrems amino- i carboxi-terminals. Potser la utilització de pèptids enlloc de proteïnes recombinants evitaria aquest problema.

Finalment, la identificació dels residus implicats en dites interaccions permetria abordar la cerca de fàrmacs des d'una altra perspectiva. No caldrien utilitzar quimiotèques combinatòries, sinó que es podria realitzar un disseny racional de molècules que específicament disruptessin determinades interaccions mitjançant estudis computacionals de *docking*.

## 9. ALTRES CONSIDERACIONS EN LA CERCA DE MOLÈCULES AMB POTENCIAL IMMUNOSUPRESSOR

Aquest treball experimental ha permès aprofundir en el coneixement de la interacció de les RCAN amb Cn i ha mostrat que la interacció C18-RCAN1-Cn pot ser una nova eina per la cerca de fàrmacs amb potencial immunosupressor. Malgrat això, la inhibició de l'activitat fosfatasa de Cn vers els NFAT no és l'única diana que es pot triar alhora d'identificar noves molècules inhibidores de la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT. A continuació es detallen altres dianes que s'han descrit en la cerca de nous immunosupressors:

1.- Bloqueig de l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través del canal CRAC. Mitjançant el cribratge d'una quimioteca formada per 16.000 molècules orgàniques petites es van identificar 14 composts que inhibeixen la translocació nuclear de NFAT en un assaig basat en cèl·lules eucariotes (Venkatesh et al., 2004). La majoria d'ells bloquegen l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través dels canals CRAC. Altres autors també han descrit que un derivat del pirazol anomenat BTP2 inhibeix específicament l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través dels canals CRAC a limfòcits T sense interferir en altres mecanismes en els quals participa el  $Ca^{2+}$  (Zitt et al., 2004). *A priori*, la inhibició de la via per sobre del nivell de Cn podria comportar teòricament l'aparició d'efectes inespecífics. En canvi, s'ha descrit que els pacients SCID amb mutacions a la proteïna ORAI1 tenen greus defectes al sistema immune però un fenotip poc sever a la resta de teixits (Feske et al., 2006). Tot i això, en l'actualitat no es coneix en detall si l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través dels canals CRAC afecta altres vies de senyalització a part de la de Cn-NFAT. Així i tot, el bloqueig de l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través dels canals CRAC podria ser una nova diana a considerar, donat que l'efecte d'aquestes molècules podria ser més específic de l'esperat.

2.- Bloqueig de la unió dels NFAT al DNA. En els darrers anys s'han identificat diverses molècules que inhibeixen la unió dels NFAT als promotors dels seus gens diana, com els salicilats que disminueixen la transcripció de diverses citokines perquè bloquegen la unió dels NFAT als seus promotors (Aceves et al., 2004); molècules de RNA, anomenades aptàmers, capaces d'unirse als RHR d'alguns membres de la família NFAT de manera específica i bloquejar la seva unió al DNA (Cho et al., 2004); i les tionamides, que són tio-derivats heterocíclics, que bloquegen la interacció dels complexos NFAT:AP-1 amb el DNA (Humar et al., 2007).

3.- Export de NFAT de nucli a citoplasma. Els ditiocarbamats inhibeixen l'expressió dependent de NFAT perquè activen la fosforilació de NFAT, possiblement a través de la quinasa JNK, i promouen la seva sortida prematura del nucli (Martinez-Martinez et al., 1997).



En conjunt, els resultats obtinguts en aquesta Tesi han permès caracteritzar l'efecte immunosupressor de la família de proteïnes RCAN vers la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT a limfòcits T humans. Aquestes dades permeten suggerir que aquestes proteïnes, i més en concret el pèptid C18 que interacciona amb Cn i inhibeix la translocació nuclear de NFAT *in vivo*, constitueix en sí mateix una nova eina immunosupressora que s'afegeix al relativament ampli arsenal de fàrmacs disponibles actualment. A diferència dels fàrmacs inhibidors de calcineurina, molt potents i específics de l'activitat enzimàtica de Cn, els resultats obtinguts amb els pèptids C18 de les RCAN, apunten a que el seu efecte immunosupressor podria ser més específic, ja que interacciona de forma directa amb Cn i podrien no inhibir la desfosforilació de tots els substrats de Cn, però sí la dels NFAT, fet que promouria l'aparició de menys efectes secundaris, que és un dels problemes cabdals dels tractaments amb CsA i FK506. En paral·lel, el desenvolupament d'un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la disrupció de la interacció C18-RCAN1-Cn representa una nova eina útil per la cerca de fàrmacs immunosupressors. Està establert que la pròpia naturalesa dels pèptids fa que sigui difícil emprar-los amb finalitats terapèutiques, per això, la cerca de molècules més petites, fàcilment difusibles i que puguin ser administrades sense que siguin ràpidament degradades, es planteja com una opció amb més potencial terapèutic que la utilització directe dels pèptids. En aquest context, el nostre treball ha permès identificar quatre hexapèptids formats per D-aminoàcids que desplacen la interacció C18-RCAN1 *in vitro* i un producte, anomenat IDI3A, amb potencial immunosupressor, tal i com han demostrat els assaigs funcionals realitzats *in vivo*. A més, no s'ha de descartar que aquests hexapèptids i aquest producte, es puguin emprar amb finalitats terapèutiques en combinació amb altres fàrmacs immunosupressors, pràctica avui en dia molt habitual. En paral·lel, les seqüències dels pèptids i l'estructura del producte IDI3A podrien ser útils com a base pel disseny de noves molècules amb la finalitat d'obtenir productes amb un major potencial immunosupressor vers la via de senyalització Cn-NFAT *in vivo*.



## CONCLUSIONS



Les Conclusions que es poden extraure del treball realitzat en aquesta Tesi són:

1. Els transcrits *RCAN1-1* i *RCAN3-1,2,3,4,5* s'expressen a nivell basal en cèl·lules Jurkat mentre que *RCAN1-4*, no. A més, l'expressió dels transcrits *RCAN1-1* i *RCAN3-1,2,3,4,5* no està regulada a través d'un senyal de  $Ca^{2+}$  i Cn, mentre que la de *RCAN1-4*, sí.

2. *RCAN1-1* interacciona físicament amb CnA en cèl·lules Jurkat tant a nivell endògen com en condicions de sobreexpressió de *RCAN1-1*. En canvi, només s'ha pogut detectar que *RCAN3-2* interacciona directament amb CnA en condicions de sobreexpressió de *RCAN3-2*.

3. Les proteïnes *RCAN1-1* i *RCAN3-2* inhibeixen la translocació de NFAT a nucli en cèl·lules estimulades amb ionomicina a través del seu motiu CIC, seqüència d'interacció amb CnA. En canvi el motiu PKIIQT de *RCAN1*, en presència d'aquest estímul, no afecta a la localització intracel·lular de NFAT. A més, el motiu CIC de *RCAN1-1* i *RCAN3-2* és el responsable directe de la inhibició de l'expressió gènica de citoquines dependents de NFAT a cèl·lules Jurkat. Per tant, la sobreexpressió del motiu CIC inhibeix la via de senyalització  $Ca^{2+}$ -Cn-NFAT i l'activació limfocitària en la línia de cèl·lules T humanes Jurkat.

4. Els pèptids C18 de les RCAN, seqüència inclosa dins el motiu CIC i amb el mateix efecte inhibidor que aquest, interaccionen amb  $CnA\alpha$  a través d'alguna regió compresa entre els aminoàcids 2-347 de  $CnA\alpha$ , mentre que el pèptid PKIIQT de *RCAN1*, en les nostres condicions experimentals, no interacciona en aquesta regió.

5. Els pèptids C18-*RCAN1* i C18-*RCAN3* interaccionen específicament amb  $CnA\alpha$  i les seves  $K_d$  són 1.25 i 0.85  $\mu M$ , respectivament. Per altra banda el pèptid SPRIEIT de NFATc2, que correspon al motiu consens PxlxIT dels NFAT, mostra una afinitat menor per  $CnA\alpha$  que les RCAN i la seva  $K_d$  és 6.25  $\mu M$ , mentre que el pèptid VIVIT, corresponent a la seqüència del pèptid SPRIEIT dels NFAT optimitzada, té una  $K_d$  per  $CnA\alpha$  de 0.63  $\mu M$ . Per tant, l'afinitat per  $CnA\alpha$  dels pèptids C18 de les RCAN és similar a la del pèptid VIVIT de NFAT.

6. Els pèptids SPRIEIT i VIVIT dels NFAT competeixen les interaccions C18-*RCAN1*-CnA i C18-*RCAN3*-CnA mentre que el pèptid LxVP, només ho fa a concentracions altes. De la mateixa manera, els pèptids C18 de les RCAN competeixen la interacció VIVIT-Cn. En canvi, el pèptid RII o els complexos CsA-CyPA i FK506-FKBP12 no competeixen les interaccions dels pèptids C18 de les RCAN amb  $CnA\alpha$ .

7. L'anàlisi per diroïsmes circulars dels pèptids C18 de les RCAN mostra que aquests pèptids adopten una conformació de tipus *random coil*.

8. S'ha dissenyat i optimitzat un assaig *in vitro* d'alta eficàcia basat en la interacció del pèptid C18-RCAN1 amb CnA per cercar molècules disruptores que mimetitzin al pèptid C18-RCAN1 en dita interacció.

9. El cribratge d'una col·lecció de composts sols ha permès identificar un producte anomenat IDI3A responsable de disruptar *in vitro* de manera significativa la interacció C18-RCAN1-Cn. L'avaluació funcional *in vivo* d'aquest producte ha mostrat que inhibeix un 25% la translocació nuclear dels NFAT i la transcripció de citoquines dependents d'aquests factors de transcripció, com *TNF*.

10. Els pèptids C18 de les RCAN són una nova eina per a la identificació i desenvolupament de fàrmacs immunosupressors.

## **BIBLIOGRAFIA**





- Abbasi, S., Lee, J. D., Su, B., Chen, X., Alcon, J. L., Yang, J., Kellems, R. E., and Xia, Y. (2006). Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1. *J Biol Chem* 281, 7717-7726.
- Abbott, K. L., Friday, B. B., Thaloor, D., Murphy, T. J., and Pavlath, G. K. (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 9, 2905-2916.
- Abe, M., and Sato, Y. (2001). cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 289-298.
- Abraham, C. C., Silk, R., Chapman, L.K., Dixon et al. Unpublished results.
- Aceves, M., Duenas, A., Gomez, C., San Vicente, E., Crespo, M. S., and Garcia-Rodriguez, C. (2004). A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *J Immunol* 173, 5721-5729.
- Adang, A. E., and Hermkens, P. H. (2001). The contribution of combinatorial chemistry to lead generation: an interim analysis. *Curr Med Chem* 8, 985-998.
- Aguilera, C., Fernandez-Majada, V., Ingles-Esteve, J., Rodilla, V., Bigas, A., and Espinosa, L. (2006). Efficient nuclear export of p65-IkappaBalpha complexes requires 14-3-3 proteins. *J Cell Sci* 119, 3695-3704.
- Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1, 627-637.
- Aramburu, J., Rao, A., and Klee, C. B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 36, 237-295.
- Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., and Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285, 2129-2133.
- Aruffo, A., and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8573-8577.
- Aspeslet, L., Freitag, D., Trepanier, D., Abel, M., Naicker, S., Kneteman, N., Foster, R., and Yatscoff, R. (2001). ISA(TX)247: a novel calcineurin inhibitor. *Transplant Proc* 33, 1048-1051.
- Aubareda, A., Mulero, M. C., and Perez-Riba, M. (2006). Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells. *Cell Signal* 18, 1430-1438.
- Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., and Rao, A. (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol* 3, 643-651.
- Baksh, S., Widlund, H. R., Frazer-Abel, A. A., Du, J., Fosmire, S., Fisher, D. E., DeCaprio, J. A., Modiano, J. F., and Burakoff, S. J. (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10, 1071-1081.
- Bandyopadhyay, A., Shin, D. W., Ahn, J. O., and Kim, D. H. (2000). Calcineurin regulates ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels in rat heart. *Biochem J* 352 Pt 1, 61-70.
- Bauerfeind, R., Takei, K., and De Camilli, P. (1997). Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* 272, 30984-30992.
- Bettelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5138-5143.
- Biswas, G., Anandatheerthavarada, H. K., Zaidi, M., and Avadhani, N. G. (2003). Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J Cell Biol* 161, 507-519.
- Bito, H., Deisseroth, K., and Tsien, R. W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87, 1203-1214.
- Black, J. (1999). Future perspectives in pharmaceutical research. *Pharm Policy Law* 1, 85-92
- Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., and Chatila, T. A. (2000). Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 275, 197-209.
- Blumenthal, D. K., Takio, K., Edelman, A. M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K. A., and Krebs, E. G. (1985). Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3187-3191.
- Blumenthal, D. K., Takio, K., Hansen, R. S., and Krebs, E. G. (1986). Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. Determinants of substrate specificity. *J Biol Chem* 261, 8140-8145.
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., and Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3, 1014-1019.
- Bodor, J., and Habener, J. F. (1998). Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *J Biol Chem* 273, 9544-9551.
- Bon, C. L., and Garthwaite, J. (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 23, 1941-1948.
- Bonnet, S., Rochefort, G., Sutendra, G., Archer, S. L., Haromy, A., Webster, L., Hashimoto, K., Bonnet, S. N., and Michelakis, E. D. (2007). The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11418-11423.

- Border, W. A., Noble, N. A., and Ketteler, M. (1995). TGF-beta: a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. *Kidney Int Suppl* 49, 559-61.
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., and Stahelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-475.
- Bottger, E. C. (1988). High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro-transformation. *Biotechniques* 6, 878-880.
- Bueno, O. F., Brandt, E. B., Rothenberg, M. E., and Molkentin, J. D. (2002a). Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9398-9403.
- Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., and Molkentin, J. D. (2002b). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4586-4591.
- Burke, T. F., Casolaro, V., and Georas, S. N. (2000). Characterization of P5, a novel NFAT/AP-1 site in the human IL-4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 1016-1023.
- Bush, C. R., Havens, J. M., Necela, B. M., Su, W., Chen, L., Yanagisawa, M., Anastasiadis, P. Z., Guerra, R., Luxon, B. A., and Thompson, E. A. (2007). Functional genomic analysis reveals cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and calcium signaling in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 282, 23387-23401.
- Canaider, S., Facchin, F., Griffoni, C., Casadei, R., Vitale, L., Lenzi, L., Frabetti, F., D'Addabbo, P., Carinci, P., Zannotti, M., and Strippoli, P. (2006). Proteins encoded by human Down syndrome critical region gene 1-like 2 (DSCR1L2) mRNA and by a novel DSCR1L2 mRNA isoform interact with cardiac troponin I (TNNI3). *Gene* 372, 128-136.
- Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., and Redondo, J. M. (2005). Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 29435-29443.
- Cao, X., Kambe, F., Miyazaki, T., Sarkar, D., Ohmori, S., and Seo, H. (2002). Novel human ZAKI-4 isoforms: hormonal and tissue-specific regulation and function as calcineurin inhibitors. *Biochem J* 367, 459-466.
- Cao, X., Kambe, F., Moeller, L. C., Refetoff, S., and Seo, H. (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19, 102-112.
- Cardenas, M. E., Muir, R. S., Breuder, T., and Heitman, J. (1995). Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *Embo J* 14, 2772-2783.
- Cardenas, M. E., Sanfridson, A., Cutler, N. S., and Heitman, J. (1998). Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *Trends Biotechnol* 16, 427-433.
- Casas, C., Martinez, S., Pritchard, M. A., Fuentes, J. J., Nadal, M., Guimera, J., Arbones, M., Florez, J., Soriano, E., Estivill, X., and Alcantara, S. (2001). Dscr1, a novel endogenous inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mech Dev* 101, 289-292.
- Cockerill, P. N., Bert, A. G., Jenkins, F., Ryan, G. R., Shannon, M. F., and Vadas, M. A. (1995). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c. *Mol Cell Biol* 15, 2071-2079.
- Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M., and Scott, J. D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267, 108-111.
- Colgan, J., Asmal, M., Yu, B., and Luban, J. (2005). Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol* 174, 6030-6038.
- Cook, C. N., Hejna, M. J., Magnuson, D. J., and Lee, J. M. (2005). Expression of calcipressin1, an inhibitor of the phosphatase calcineurin, is altered with aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8, 63-73.
- Cousin, M. A., and Robinson, P. J. (2001). The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci* 24, 659-665.
- Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63, 1045-1083.
- Chan, B., Greenan, G., McKeon, F., and Ellenberger, T. (2005). Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13075-13080.
- Chang, K. T., Shi, Y. J., and Min, K. T. (2003). The Drosophila homolog of Down's syndrome critical region 1 gene regulates learning: implications for mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15794-15799.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
- Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A., and Harrison, S. C. (1998). Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392, 42-48.
- Childs, T. E., Spangenburg, E. E., Vyas, D. R., and Booth, F. W. (2003). Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C391-398.
- Cho, J. S., Lee, Y. J., Shin, K. S., Jeong, S., Park, J., and Lee, S. W. (2004). In vitro selection of specific RNA aptamers for the NFAT DNA binding domain. *Mol Cells* 18, 17-23.
- Cho, Y. J., Abe, M., Kim, S. Y., and Sato, Y. (2005). Raf-1 is a binding partner of DSCR1. *Arch Biochem Biophys* 439, 121-128.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Dagert, M., and Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6, 23-28.

- Dave, V., Childs, T., Xu, Y., Ikegami, M., Besnard, V., Maeda, Y., Wert, S. E., Neilson, J. R., Crabtree, G. R., and Whitsett, J. A. (2006). Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J Clin Invest* 116, 2597-2609.
- Davies, K. J., Ermak, G., Rothermel, B. A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahnn, J., Henrique-Silva, F., Crawford, D., Canaider, S., Strippoli, P., *et al.* (2007). Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *Faseb J* 21, 3023-3028.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R., and Snyder, S. H. (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9808-9812.
- de la Pompa, J. L., Timmerman, L. A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A. J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B. L., *et al.* (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392, 182-186.
- De Windt, L. J., Lim, H. W., Bueno, O. F., Liang, Q., Delling, U., Braz, J. C., Glascock, B. J., Kimball, T. F., del Monte, F., Hajjar, R. J., and Molkenin, J. D. (2001). Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3322-3327.
- Dell'Acqua, M. L., Dodge, K. L., Tavalin, S. J., and Scott, J. D. (2002). Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *J Biol Chem* 277, 48796-48802.
- Dell'Acqua, M. L., Smith, K. E., Gorski, J. A., Horne, E. A., Gibson, E. S., and Gomez, L. L. (2006). Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol* 85, 627-633.
- Diebold, R. J., Rajaram, N., Leonard, D. A., and Kerppola, T. K. (1998). Molecular basis of cooperative DNA bending and oriented heterodimer binding in the NFAT1-Fos-Jun-ARRE2 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7915-7920.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.
- Donella-Deana, A., Krinks, M. H., Ruzzene, M., Klee, C., and Pinna, L. A. (1994). Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). *Eur J Biochem* 219, 109-117.
- Dong, S., and Twardy, D. J. (2002). Interactions of STAT5b-RARalpha, a novel acute promyelocytic leukemia fusion protein, with retinoic acid receptor and STAT3 signaling pathways. *Blood* 99, 2637-2646.
- Dumont, F. J. (2000). FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem* 7, 731-748.
- Duncliffe, K. N., Bert, A. G., Vadas, M. A., and Cockerill, P. N. (1997). A T cell-specific enhancer in the interleukin-3 locus is activated cooperatively by Oct and NFAT elements within a DNase I-hypersensitive site. *Immunity* 6, 175-185.
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghanel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J. U., and Fischer, G. (2005). Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Embo J* 24, 2688-2699.
- Enz, A., Shapiro, G., Chappuis, A., and Dattler, A. (1994). Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Anal Biochem* 216, 147-153.
- Ermak, G., Cheadle, C., Becker, K. G., Harris, C. D., and Davies, K. J. (2004). DSCR1(Adapt78) modulates expression of SOD1. *Faseb J* 18, 62-69.
- Ermak, G., Harris, C. D., Battocchio, D., and Davies, K. J. (2006). RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3beta. *Febs J* 273, 2100-2109.
- Ermak, G., Harris, C. D., and Davies, K. J. (2002). The DSCR1 (Adapt78) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *Faseb J* 16, 814-824.
- Ermak, G., Morgan, T. E., and Davies, K. J. (2001). Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276, 38787-38794.
- Esau, C., Boes, M., Youn, H. D., Tattersson, L., Liu, J. O., and Chen, J. (2001). Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J Exp Med* 194, 1449-1459.
- Faux, M. C., and Scott, J. D. (1996). Molecular glue: kinase anchoring and scaffold proteins. *Cell* 85, 9-12.
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7, 690-702.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Feys, T., Poppe, B., De Preter, K., Van Roy, N., Verhasselt, B., De Paepe, P., De Paepe, A., and Speleman, F. (2007). A detailed inventory of DNA copy number alterations in four commonly used Hodgkin's lymphoma cell lines. *Haematologica* 92, 913-920.
- Fox, D. S., and Heitman, J. (2005). Calcineurin-binding protein Cbp1 directs the specificity of calcineurin-dependent hyphal elongation during mating in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4, 1526-1538.
- Frey, N., Barrientos, T., Shelton, J. M., Frank, D., Rutten, H., Gehring, D., Kuhn, C., Lutz, M., Rothermel, B., Bassel-Duby, R., *et al.* (2004). Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med* 10, 1336-1343.
- Frey, N., McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (2000a). Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 6, 1221-1227.

- Frey, N., and Olson, E. N. (2002). Calcarsin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calcarsin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem* 277, 13998-14004.
- Frey, N., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2000b). Calcarsins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14632-14637.
- Friday, B. B., Horsley, V., and Pavlath, G. K. (2000). Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol* 149, 657-666.
- Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M., and Pavlath, G. K. (2003). Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 71, 217-227.
- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1992). Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3686-3690.
- Fuentes, J. J., Genesca, L., Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W., Perez-Riba, M., Estivill, X., and de la Luna, S. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* 9, 1681-1690.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., and Estivill, X. (1997). Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* 44, 358-361.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., Planas, A. M., Bosch, A., Ferrer, I., and Estivill, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* 4, 1935-1944.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 276, 5836-5840.
- Gaestel, M., Benndorf, R., Hayess, K., Priemer, E., and Engel, K. (1992). Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. *J Biol Chem* 267, 21607-21611.
- Garcia-Cozar, F. J., Okamura, H., Aramburu, J. F., Shaw, K. T., Pelletier, L., Showalter, R., Villafranca, E., and Rao, A. (1998). Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J Biol Chem* 273, 23877-23883.
- Gaymes, T. J., Cebrat, M., Siemion, I. Z., and Kay, J. E. (1997). Cyclolinopeptide A (CLA) mediates its immunosuppressive activity through cyclophilin-dependent calcineurin inactivation. *FEBS Lett* 418, 224-227.
- Genesca, L., Aubareda, A., Fuentes, J. J., Estivill, X., De La Luna, S., and Perez-Riba, M. (2003). Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J* 374, 567-575.
- Giri, P. R., Higuchi, S., and Kincaid, R. L. (1991). Chromosomal mapping of the human genes for the calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin) catalytic subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 252-258.
- Glover, J. N., and Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373, 257-261.
- Goldfeld, A. E., McCaffrey, P. G., Strominger, J. L., and Rao, A. (1993). Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J Exp Med* 178, 1365-1379.
- Golebiowski, A., Klopfenstein, S. R., and Portlock, D. E. (2001). Lead compounds discovered from libraries. *Curr Opin Chem Biol* 5, 273-284.
- Gollogly, L. K., Ryeom, S. W., and Yoon, S. S. (2007). Down syndrome candidate region 1-like 1 (DSCR1-L1) mimics the inhibitory effects of DSCR1 on calcineurin signaling in endothelial cells and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 142, 129-136.
- Gorlach, J., Fox, D. S., Cutler, N. S., Cox, G. M., Perfect, J. R., and Heitman, J. (2000). Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calcipressin, in *Cryptococcus neoformans*. *Embo J* 19, 3618-3629.
- Gothel, S. F., and Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55, 423-436.
- Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y., and Miyamoto, E. (1985). Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem* 45, 276-283.
- Graef, I. A., Chen, F., and Crabtree, G. R. (2001a). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 11, 505-512.
- Graef, I. A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A., and Crabtree, G. R. (2001b). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105, 863-875.
- Graef, I. A., Mermelstein, P. G., Stankunas, K., Neilson, J. R., Deisseroth, K., Tsien, R. W., and Crabtree, G. R. (1999). L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 401, 703-708.
- Graef, I. A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., and Crabtree, G. R. (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell* 113, 657-670.
- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K., and Navia, M. A. (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-522.
- Gualberto, A., Marquez, G., Carballo, M., Youngblood, G. L., Hunt, S. W., 3rd, Baldwin, A. S., and Sobrino, F. (1998). p53 transactivation of the HIV-1 long terminal repeat is blocked by PD 144795, a calcineurin-inhibitor with anti-HIV properties. *J Biol Chem* 273, 7088-7093.
- Gump, J. M., and Dowdy, S. F. (2007). TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med* 13, 443-448.



- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2007). Signalling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42, 145-156.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P. G., and Rao, A. (2006). A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441, 646-650.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., and Montminy, M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70, 105-113.
- Halloran, P. F. (2001). Mechanism of action of the calcineurin inhibitors. *Transplant Proc* 33, 3067-3069.
- Hann, M. M., Leach, A. R., and Harper, G. (2001). Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci* 41, 856-864.
- Haq, S., Choukroun, G., Lim, H., Tymitz, K. M., del Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R., Force, T., and Molkentin, J. D. (2001). Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103, 670-677.
- Harris, C. D., Ermak, G., and Davies, K. J. (2005). Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell Mol Life Sci* 62, 2477-2486.
- Harris, C. D., Ermak, G., and Davies, K. J. (2007). RCAN1-1L is overexpressed in neurons of Alzheimer's disease patients. *FEBS J* 274, 1715-1724.
- Hashimoto, Y., Perrino, B. A., and Soderling, T. R. (1990). Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *J Biol Chem* 265, 1924-1927.
- Heit, J. J., Apelqvist, A. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R., and Kim, S. K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443, 345-349.
- Hernandez, G. L., Volpert, O. V., Iniguez, M. A., Lorenzo, E., Martinez-Martinez, S., Grau, R., Fresno, M., and Redondo, J. M. (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193, 607-620.
- Hesser, B. A., Liang, X. H., Camenisch, G., Yang, S., Lewin, D. A., Scheller, R., Ferrara, N., and Gerber, H. P. (2004). Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1), a novel VEGF target gene that regulates expression of inflammatory markers on activated endothelial cells. *Blood* 104, 149-158.
- Hilioti, Z., and Cunningham, K. W. (2003). The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1089-1093.
- Hilioti, Z., Gallagher, D. A., Low-Nam, S. T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T. J., Birchwood, C. J., Lvchenko, A., and Cunningham, K. W. (2004). GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev* 18, 35-47.
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W., and Glimcher, L. H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973-983.
- Ho, I. C., Lo, D., and Glimcher, L. H. (1998). c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 188, 1859-1866.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T., and Suthanthiran, M. (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397, 530-534.
- Huai, Q., Kim, H. Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J. O., and Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12037-12042.
- Humar, M., Dohrmann, H., Stein, P., Andriopoulos, N., Goebel, U., Heimrich, B., Roesslein, M., Schmidt, R., Schwer, C., Hoetzel, A., *et al.* (2007). Repression of T-cell function by thionamides is mediated by inhibition of the AP-1/NFAT pathway and is associated with a common structure. *Mol Pharmacol*.
- Iacobelli, M., Wachsmann, W., and McGuire, K. L. (2000). Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein. *J Immunol* 165, 860-868.
- Iizuka, M., Abe, M., Shiiba, K., Sasaki, I., and Sato, Y. (2004). Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J Vasc Res* 41, 334-344.
- Iniguez, M. A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J. M., and Fresno, M. (2000). An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275, 23627-23635.
- Jain, J., Loh, C., and Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7, 333-342.
- Jang, H., Cho, E. J., and Youn, H. D. (2007). A new calcineurin inhibition domain in Cabin1. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 129-135.
- Jiang, B., and Cyert, M. S. (1999). Identification of a novel region critical for calcineurin function in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 274, 18543-18551.
- Jiang, H., Xiong, F., Kong, S., Ogawa, T., Kobayashi, M., and Liu, J. O. (1997). Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol Immunol* 34, 663-669.
- Jin, L., and Harrison, S. C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13522-13526.
- Jovanovic, J. N., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., and Czernik, A. J. (2001). Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* 21, 7944-7953.

- Kahan, B. D. (2002). The limitations of calcineurin and mTOR inhibitors: new directions for immunosuppressive strategies. *Transplant Proc* 34, 130-133.
- Kahan, B. D. (2003). Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol* 3, 831-838.
- Kang, C. B., Feng, L., Chia, J., and Yoon, H. S. (2005a). Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 30-38.
- Kang, S., Li, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (2005b). Inhibition of the calcineurin-NFAT interaction by small organic molecules reflects binding at an allosteric site. *J Biol Chem* 280, 37698-37706.
- Kashishian, A., Howard, M., Loh, C., Gallatin, W. M., Hoekstra, M. F., and Lai, Y. (1998). AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem* 273, 27412-27419.
- Ke, H., and Huai, Q. (2003). Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1095-1102.
- Keating, D. J., Chen, C., and Pritchard, M. A. (2006). Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1. *Ageing Res Rev* 5, 388-401.
- Kennedy, M. T., Brockman, H., and Rusnak, F. (1996). Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *J Biol Chem* 271, 26517-26521.
- Kessen, U., Schaloske, R., Aichem, A., and Mutzel, R. (1999). Ca(2+)/calmodulin-independent activation of calcineurin from Dictyostelium by unsaturated long chain fatty acids. *J Biol Chem* 274, 37821-37826.
- Khanna, A., Kapur, S., Sharma, V., Li, B., and Suthanthiran, M. (1997). In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 63, 1037-1039.
- Kiani, A., Rao, A., and Aramburu, J. (2000). Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12, 359-372.
- Kim, Y. S., Cho, K. O., Lee, H. J., Kim, S. Y., Sato, Y., and Cho, Y. J. (2006). Down syndrome candidate region 1 increases the stability of the I $\kappa$ B protein: implications for its anti-inflammatory effects. *J Biol Chem* 281, 39051-39061.
- King, M. M., and Huang, C. Y. (1984). The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *J Biol Chem* 259, 8847-8856.
- King, M. M., Huang, C. Y., Chock, P. B., Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr., Chan, K. F., and Greengard, P. (1984). Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J Biol Chem* 259, 8080-8083.
- Kingsbury, T. J., and Cunningham, K. W. (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14, 1595-1604.
- Kino, T., Inamura, N., Sakai, F., Nakahara, K., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Ochiai, T. (1987). Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc* 19, 36-39.
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W., and et al. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378, 641-644.
- Klee, C. B., Crouch, T. H., and Krinks, M. H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6270-6273.
- Klee, C. B., Ren, H., and Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273, 13367-13370.
- Klee, C. B., Wang, X. R. (1999). Calcium as a Cellular Regulator).
- Knowles, J., Gromo, G. (2003). Target selection in drug discovery. *Nature Reviews* 2, 63-69.
- Kuprash, D. V., Boitchenko, V. E., Yarovinsky, F. O., Rice, N. R., Nordheim, A., Ruhlmann, A., and Nedospasov, S. A. (2002). Cyclosporin A blocks the expression of lymphotoxin alpha, but not lymphotoxin beta, in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 100, 1721-1727.
- Kuriyama, M., Matsushita, M., Tateishi, A., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Ishino, K., Sano, S., and Matsui, H. (2006). A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chem Biol Drug Des* 67, 238-243.
- Ladner, C. J., Czech, J., Maurice, J., Lorens, S. A., and Lee, J. M. (1996). Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 924-931.
- Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 273, 18325-18331.
- Lam, E., Martin, M. M., Timerman, A. P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R. T., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A., and Wiederrecht, G. J. (1995). A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 270, 26511-26522.
- Lange, A. W., Molkentin, J. D., and Yutzey, K. E. (2004). DSCR1 gene expression is dependent on NFATc1 during cardiac valve formation and colocalizes with anomalous organ development in trisomy 16 mice. *Dev Biol* 266, 346-360.
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., and Koretzky, G. A. (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 272, 31427-31434.
- Lautermilch, N. J., and Spitzer, N. C. (2000). Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci* 20, 315-325.
- Leach, A. R., and Hann, M. M. (2000). The in silico world of virtual libraries. *Drug Discov Today* 5, 326-336.
- Leahy, K. P., and Crawford, D. R. (2000). adapt78 protects cells against stress damage and suppresses cell growth. *Arch Biochem Biophys* 379, 221-228.

- Lee, D. U., Avni, O., Chen, L., and Rao, A. (2004). A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem* 279, 4802-4810.
- Li, H., Rao, A., and Hogan, P. G. (2004). Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J Mol Biol* 342, 1659-1674.
- Li, H., Zhang, L., Rao, A., Harrison, S. C., and Hogan, P. G. (2007). Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *J Mol Biol* 369, 1296-1306.
- Lieberman, D. N., and Mody, I. (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369, 235-239.
- Lim, H. W., and Molkentin, J. D. (1999). Calcineurin and human heart failure. *Nat Med* 5, 246-247.
- Lin, H. Y., Michtalik, H. J., Zhang, S., Andersen, T. T., Van Riper, D. A., Davies, K. K., Ermak, G., Petti, L. M., Nachod, S., Narayan, A. V., *et al.* (2003). Oxidative and calcium stress regulate DSCR1 (Adapt78/MCIP1) protein. *Free Radic Biol Med* 35, 528-539.
- Lin, X., Sikkink, R. A., Rusnak, F., and Barber, D. L. (1999). Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J Biol Chem* 274, 36125-36131.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9574-9578.
- Liu, J., Arai, K., and Arai, N. (2001). Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: disrupting the interaction of NFATx with calcineurin. *J Immunol* 167, 2677-2687.
- Liu, J., Masuda, E. S., Tsuruta, L., Arai, N., and Arai, K. (1999). Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *J Immunol* 162, 4755-4761.
- Liu, Z., Zhang, C., Dronadula, N., Li, Q., and Rao, G. N. (2005). Blockade of nuclear factor of activated T cells activation signaling suppresses balloon injury-induced neointima formation in a rat carotid artery model. *J Biol Chem* 280, 14700-14708.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Luo, C., Shaw, K. T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B. A., Hogan, P. G., and Rao, A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8907-8912.
- Ma, H., Xiong, H., Liu, T., Zhang, L., Godzik, A., and Zhang, Z. (2004). Aggregate formation and synaptic abnormality induced by DSCR1. *J Neurochem* 88, 1485-1496.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5, 472-484.
- Macian, F., Garcia-Rodriguez, C., and Rao, A. (2000). Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *Embo J* 19, 4783-4795.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.
- Magne, S., Caron, S., Charon, M., Rouyez, M. C., and Dusanter-Fourt, I. (2003). STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression. *Mol Cell Biol* 23, 8934-8945.
- Malet, G., Martin, A. G., Orzaez, M., Vicent, M. J., Masip, I., Sanclimens, G., Ferrer-Montiel, A., Mingarro, I., Messeguer, A., Fearnhead, H. O., and Perez-Paya, E. (2006). Small molecule inhibitors of Apaf-1-related caspase-3/-9 activation that control mitochondrial-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1523-1532.
- Mammucari, C., Tommasi di Vignano, A., Sharov, A. A., Neilson, J., Havrda, M. C., Roop, D. R., Botchkarev, V. A., Crabtree, G. R., and Dotto, G. P. (2005). Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* 8, 665-676.
- Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1995). Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging* 16, 355-362; discussion 362-353.
- Mann, K. M., Ray, J. L., Moon, E. S., Sass, K. M., and Benson, M. R. (2004). Calcineurin initiates smooth muscle differentiation in neural crest stem cells. *J Cell Biol* 165, 483-491.
- Martinez-Martinez, S., Gomez del Arco, P., Armesilla, A. L., Aramburu, J., Luo, C., Rao, A., and Redondo, J. M. (1997). Blockade of T-cell activation by dithiocarbamates involves novel mechanisms of inhibition of nuclear factor of activated T cells. *Mol Cell Biol* 17, 6437-6447.
- Martinez-Martinez, S., Rodriguez, A., Lopez-Maderuelo, M. D., Ortega-Perez, I., Vazquez, J., and Redondo, J. M. (2006). Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281, 6227-6235.
- Marunaka, Y., Niisato, N., and Shintani, Y. (1998). Protein phosphatase 2B-dependent pathway of insulin action on single Cl- channel conductance in renal epithelium. *J Membr Biol* 161, 235-245.
- Masip, I., Messeguer, A. (2002). *Revista de la Societat Catalana de Química* 3, 12-21.
- Masip, I., Perez-Paya, E., and Messeguer, A. (2005). Peptoids as source of compounds eliciting antibacterial activity. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 235-239.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.
- McCaffrey, P. G., Goldfeld, A. E., and Rao, A. (1994). The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 269, 30445-30450.
- Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, M. R., Takabe, W., Noguchi, N., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T., *et al.* (2004). Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem* 279, 50537-50554.

- Minami, T., Miura, M., Aird, W. C., and Kodama, T. (2006). Thrombin-induced autoinhibitory factor, Down syndrome critical region-1, attenuates NFAT-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammation in the endothelium. *J Biol Chem* 281, 20503-20520.
- Minguillon, J., Moranchó, B., Kim, S. J., Lopez-Botet, M., and Aramburu, J. (2005). Concentrations of cyclosporin A and FK506 that inhibit IL-2 induction in human T cells do not affect TGF-beta1 biosynthesis, whereas higher doses of cyclosporin A trigger apoptosis and release of preformed TGF-beta1. *J Leukoc Biol* 77, 748-758.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., and Dixon, L. K. (2000). African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J Virol* 74, 9412-9420.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C., and Dixon, L. K. (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281, 562-565.
- Mitchell, A. N., Jayakumar, L., Koleilat, I., Qian, J., Sheehan, C., Bhoiwala, D., Hushmendy, S. F., Heuring, J. M., and Crawford, D. R. (2007). Brain expression of the calcineurin inhibitor RCAN1 (Adapt78). *Arch Biochem Biophys*.
- Miyakawa, T., Leiter, L. M., Gerber, D. J., Gainetdinov, R. R., Sotnikova, T. D., Zeng, H., Caron, M. G., and Tonegawa, S. (2003). Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8987-8992.
- Miyazaki, T., Kanou, Y., Murata, Y., Ohmori, S., Niwa, T., Maeda, K., Yamamura, H., and Seo, H. (1996). Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 14567-14571.
- Mizuno, Y., Kanou, Y., Rogatcheva, M., Imai, T., Refetoff, S., Seo, H., and Murata, Y. (2004). Genomic organization of mouse ZAKI-4 gene that encodes ZAKI-4 alpha and beta isoforms, endogenous calcineurin inhibitors, and changes in the expression of these isoforms by thyroid hormone in adult mouse brain and heart. *Eur J Endocrinol* 150, 371-380.
- Molkenkin, J. D. (2001). Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ Res* 88, 1220-1222.
- Molkenkin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., and Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Mora, P., Masip, I., Cortes, N., Marquina, R., Merino, R., Merino, J., Carbonell, T., Mingarro, I., Messegue, A., and Perez-Paya, E. (2005). Identification from a positional scanning peptoid library of in vivo active compounds that neutralize bacterial endotoxins. *J Med Chem* 48, 1265-1268.
- Mulero, M. C., Aubareda, A., Schluter, A., and Perez-Riba, M. (2007). RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1773, 330-341.
- Muntean, A. G., Ge, Y., Taub, J. W., and Crispino, J. D. (2006). Transcription factor GATA-1 and Down syndrome leukemogenesis. *Leuk Lymphoma* 47, 986-997.
- Muramatsu, T., and Kincaid, R. L. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun* 188, 265-271.
- Musaro, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581-585.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., et al. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 287, 2196-2204.
- Narayan, A. V., Stadel, R., Hahn, A. B., Bhoiwala, D. L., Cornielle, G., Sarazin, E., Koleilat, I., and Crawford, D. R. (2005). Redox response of the endogenous calcineurin inhibitor Adapt 78. *Free Radic Biol Med* 39, 719-727.
- Noguchi, H., Matsushita, M., Okitsu, T., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Kang, S., Li, S. T., Kobayashi, N., Matsumoto, S., Tanaka, K., et al. (2004). A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 10, 305-309.
- Oh, M., Rybkin, I., Copeland, V., Czubryt, M. P., Shelton, J. M., van Rooij, E., Richardson, J. A., Hill, J. A., De Windt, L. J., Bassel-Duby, R., et al. (2005). Calcineurin is necessary for the maintenance but not embryonic development of slow muscle fibers. *Mol Cell Biol* 25, 6629-6638.
- Oliveria, S. F., Dell'Acqua, M. L., and Sather, W. A. (2007). AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 55, 261-275.
- Orzaez, M., Mondragon, L., Marzo, I., Sanclimens, G., Messegue, A., Perez-Paya, E., and Vicent, M. J. (2007). Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: effective methods to improve inhibition of mitochondria-mediated apoptosis. *Peptides* 28, 958-968.
- Oukka, M., Ho, I. C., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 9, 295-304.
- Pan, F., Means, A. R., and Liu, J. O. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates nuclear export of Cabin1 during T-cell activation. *Embo J* 24, 2104-2113.
- Pan, F., Sun, L., Kardian, D. B., Whartenby, K. A., Pardoll, D. M., and Liu, J. O. (2007). Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* 445, 433-436.
- Pan, F., Ye, Z., Cheng, L., and Liu, J. O. (2004). Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes: a calcium signaling module that is distinct from but collaborates with the nuclear factor of activated T cells (NFAT). *J Biol Chem* 279, 14477-14480.
- Park, S., Uesugi, M., and Verdine, G. L. (2000). A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7130-7135.
- Parsons, S. A., Millay, D. P., Wilkins, B. J., Bueno, O. F., Tsika, G. L., Neilson, J. R., Liberatore, C. M., Yutzey, K. E., Crabtree, G. R., Tsika, R. W., and Molkenkin, J. D. (2004). Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem* 279, 26192-26200.



- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R., and Olson, E. N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest* 105, 1395-1406.
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., and Levin, E. R. (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *J Biol Chem* 280, 26339-26348.
- Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M., and Glimcher, L. H. (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14, 13-20.
- Perrin, F. (1926). Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J Phys Radium V* 7, 390-401.
- Pfister, S. C., Machado-Santelli, G. M., Han, S. W., and Henrique-Silva, F. (2002). Mutational analyses of the signals involved in the subcellular location of DSCR1. *BMC Cell Biol* 3, 24.
- Pflugl, G., Kallen, J., Schirmer, T., Jansonius, J. N., Zurini, M. G., and Walkinshaw, M. D. (1993). X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* 361, 91-94.
- Politino, M., and King, M. M. (1987). Calcium- and calmodulin-sensitive interactions of calcineurin with phospholipids. *J Biol Chem* 262, 10109-10113.
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., Davies, K. J., and Grune, T. (2006). Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J* 400, 511-520.
- Porta, S., Marti, E., de la Luna, S., and Arbones, M. L. (2007a). Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggests selective functions for these proteins in the brain. *Eur J Neurosci* 26, 1213-1226.
- Porta, S., Serra, S. A., Huch, M., Valverde, M. A., Llorens, F., Estivill, X., Arbones, M. L., and Marti, E. (2007b). RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 16, 1039-1050.
- Potter, A. A., Nestmann, E. R., and Iyer, V. N. (1984). Introduction of the plasmid pKM101-associated muc genes into *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 131, 197-204.
- Qin, L., Zhao, D., Liu, X., Nagy, J. A., Hoang, M. V., Brown, L. F., Dvorak, H. F., and Zeng, H. (2006). Down syndrome candidate region 1 isoform 1 mediates angiogenesis through the calcineurin-NFAT pathway. *Mol Cancer Res* 4, 811-820.
- Ranger, A. M., Grusby, M. J., Hodge, M. R., Gravalles, E. M., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H. S., and Glimcher, L. H. (1998a). The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392, 186-190.
- Ranger, A. M., Hodge, M. R., Gravalles, E. M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F. W., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M., and Glimcher, L. H. (1998b). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 8, 125-134.
- Rao, A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15, 274-281.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707-747.
- Rengarajan, J., Mowen, K. A., McBride, K. D., Smith, E. D., Singh, H., and Glimcher, L. H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195, 1003-1012.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Vinuela, E., and Fresno, M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded I kappaB-like protein. *J Biol Chem* 273, 5405-5411.
- Ritter, O., Hack, S., Schuh, K., Rothlein, N., Perrot, A., Osterziel, K. J., Schulte, H. D., and Neyses, L. (2002). Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 105, 2265-2269.
- Rodriguez, A., Martinez-Martinez, S., Lopez-Maderuelo, M. D., Ortega-Perez, I., and Redondo, J. M. (2005). The linker region joining the catalytic and the regulatory domains of CnA is essential for binding to NFAT. *J Biol Chem* 280, 9980-9984.
- Roehrl, M. H., Kang, S., Aramburu, J., Wagner, G., Rao, A., and Hogan, P. G. (2004). Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7554-7559.
- Rooney, J. W., Sun, Y. L., Glimcher, L. H., and Hoey, T. (1995). Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 15, 6299-6310.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., et al. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- Rothermel, B., Vega, R. B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000). A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275, 8719-8725.
- Rothermel, B. A., McKinsey, T. A., Vega, R. B., Nicol, R. L., Mammen, P., Yang, J., Antos, C. L., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., and Williams, R. S. (2001). Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3328-3333.
- Ryder, J. W., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., and Zierath, J. R. (2003). Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. *J Biol Chem* 278, 44298-44304.
- Ryeom, S., Greenwald, R. J., Sharpe, A. H., and McKeon, F. (2003). The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. *Nat Immunol* 4, 874-881.

- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S. H. (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35-43.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakuma, K., Nishikawa, J., Nakao, R., Watanabe, K., Totsuka, T., Nakano, H., Sano, M., and Yasuhara, M. (2003). Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathol (Berl)* 105, 271-280.
- Sanna, B., Brandt, E. B., Kaiser, R. A., Pfluger, P., Witt, S. A., Kimball, T. R., van Rooij, E., De Windt, L. J., Rothenberg, M. E., Tschop, M. H., *et al.* (2006). Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7327-7332.
- Savignac, M., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch* 454, 523-533.
- Schuh, K., Twardzik, T., Kneitz, B., Heyer, J., Schimpl, A., and Serfling, E. (1998). The interleukin 2 receptor alpha chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 188, 1369-1373.
- Semsarian, C., Wu, M. J., Ju, Y. K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D. G., Harvey, R. P., and Graham, R. M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400, 576-581.
- Shibasaki, F., Hallin, U., and Uchino, H. (2002). Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem (Tokyo)* 131, 1-15.
- Shirane, M., and Nakayama, K. I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 28-37.
- Siddiq, A., Miyazaki, T., Takagishi, Y., Kanou, Y., Hayasaka, S., Inouye, M., Seo, H., and Murata, Y. (2001). Expression of ZAKI-4 messenger ribonucleic acid in the brain during rat development and the effect of hypothyroidism. *Endocrinology* 142, 1752-1759.
- Sieber, M., Karanik, M., Brandt, C., Blex, C., Podtschaske, M., Erdmann, F., Rost, R., Serfling, E., Liebscher, J., Patzel, M., *et al.* (2007). Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3. *Eur J Immunol* 37, 2617-2626.
- Silk, R. N., Bowick, G. C., Abrams, C. C., and Dixon, L. K. (2007). African swine fever virus A238L inhibitor of NF-kappaB and of calcineurin phosphatase is imported actively into the nucleus and exported by a CRM1-mediated pathway. *J Gen Virol* 88, 411-419.
- Silveira, H. C., Sommer, C. A., Soares-Costa, A., and Henrique-Silva, F. (2004). A calcineurin inhibitory protein overexpressed in Down's syndrome interacts with the product of a ubiquitously expressed transcript. *Braz J Med Biol Res* 37, 785-789.
- Stathatos, N., Bourdeau, I., Espinosa, A. V., Saji, M., Vasko, V. V., Burman, K. D., Stratakis, C. A., and Ringel, M. D. (2005). KiSS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5432-5440.
- Stemmer, P. M., and Klee, C. B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33, 6859-6866.
- Strippoli, P., Lenzi, L., Petrini, M., Carinci, P., and Zannotti, M. (2000a). A new gene family including DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) and ZAKI-4: characterization from yeast to human and identification of DSCR1-like 2, a novel human member (DSCR1L2). *Genomics* 64, 252-263.
- Strippoli, P., Petrini, M., Lenzi, L., Carinci, P., and Zannotti, M. (2000b). The murine DSCR1-like (Down syndrome candidate region 1) gene family: conserved syntenic with the human orthologous genes. *Gene* 257, 223-232.
- Sun, L., Youn, H. D., Loh, C., Stolow, M., He, W., and Liu, J. O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 8, 703-711.
- Swanson, S. K., Born, T., Zydowsky, L. D., Cho, H., Chang, H. Y., Walsh, C. T., and Rusnak, F. (1992). Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3741-3745.
- Tait, S. W., Reid, E. B., Greaves, D. R., Wileman, T. E., and Powell, P. P. (2000). Mechanism of inactivation of NF-kappa B by a viral homologue of I kappa b alpha. Signal-induced release of I kappa b alpha results in binding of the viral homologue to NF-kappa B. *J Biol Chem* 275, 34656-34664.
- Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1997). Four P-like elements are required for optimal transcription of the mouse IL-4 gene: involvement of a distinct set of nuclear factor of activated T cells and activator protein-1 family proteins. *Int Immunol* 9, 1329-1338.
- Takeuchi, K., Roehrl, M. H., Sun, Z. Y., and Wagner, G. (2007). Structure of the calcineurin-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates. *Structure* 15, 587-597.
- Talmadge, R. J., Otis, J. S., Rittler, M. R., Garcia, N. D., Spencer, S. R., Lees, S. J., and Naya, F. J. (2004). Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion. *BMC Cell Biol* 5, 28.
- Tian, J., and Karin, M. (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* 274, 15173-15180.
- U, M., Shen, L., Oshida, T., Miyauchi, J., Yamada, M., and Miyashita, T. (2004). Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia* 18, 1850-1856.
- Usary, J., Llaca, V., Karaca, G., Presswala, S., Karaca, M., He, X., Langerod, A., Karsen, R., Oh, D. S., Dressler, L. G., *et al.* (2004). Mutation of GATA3 in human breast tumors. *Oncogene* 23, 7669-7678.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1991). Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* 252, 839-842.

- van Rooij, E., Doevendans, P. A., Crijns, H. J., Heeneman, S., Lips, D. J., van Bilsen, M., Williams, R. S., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., Rothermel, B. A., and De Windt, L. J. (2004). MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 94, e18-26.
- Vega, R. B., Rothermel, B. A., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., Naseem, R. H., Bassel-Duby, R., Williams, R. S., and Olson, E. N. (2003). Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 669-674.
- Vega, R. B., Yang, J., Rothermel, B. A., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2002). Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem* 277, 30401-30407.
- Venkatesh, N., Feng, Y., DeDecker, B., Yacono, P., Golan, D., Mitchison, T., and McKeon, F. (2004). Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8969-8974.
- Vicent, M. J., and Perez-Paya, E. (2006). Poly-L-glutamic acid (PGA) aided inhibitors of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1): an antiapoptotic polymeric nanomedicine. *J Med Chem* 49, 3763-3765.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312, 1220-1223.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., and Reed, J. C. (1999). Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.
- Wang, H. Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K. I., and Nishimura, M. (2005). Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. *Hum Mol Genet* 14, 1889-1902.
- Wang, M. G., Yi, H., Guerini, D., Klee, C. B., and McBride, O. W. (1996a). Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively. *Cytogenet Cell Genet* 72, 236-241.
- Wang, X., Culotta, V. C., and Klee, C. B. (1996b). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* 383, 434-437.
- Wang, Y., De Keulenaer, G. W., Weinberg, E. O., Muangman, S., Gualberto, A., Landschulz, K. T., Turi, T. G., Thompson, J. F., and Lee, R. T. (2002). Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H533-539.
- Weiwad, M., Edlich, F., Erdmann, F., Jarczowski, F., Kilka, S., Dorn, M., Pechstein, A., and Fischer, G. (2005). A reassessment of the inhibitory capacity of human FKBP38 on calcineurin. *FEBS Lett* 579, 1591-1596.
- Winder, D. G., and Sweatt, J. D. (2001). Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2, 461-474.
- Winslow, M. M., Pan, M., Starbuck, M., Gallo, E. M., Deng, L., Karsenty, G., and Crabtree, G. R. (2006). Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10, 771-782.
- Wu, H., Kao, S. C., Barrientos, T., Baldwin, S. H., Olson, E. N., Crabtree, G. R., Zhou, B., and Chang, C. P. (2007a). DSCR1 is a transcriptional target of NFATc1 within the endocardium during heart development. *J Biol Chem*.
- Wu, H., Peisley, A., Graef, I. A., and Crabtree, G. R. (2007b). NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol* 17, 251-260.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., et al. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375-387.
- Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk, D. C., Curran, T., and Rao, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272, 892-895.
- Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000a). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87, E61-68.
- Yang, S. A., and Klee, C. B. (2000). Low affinity Ca<sup>2+</sup>-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry* 39, 16147-16154.
- Yang, X. Y., Wang, L. H., Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H., DaSilva, L., and Farrar, W. L. (2000b). Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275, 4541-4544.
- Yao, Y. G., and Duh, E. J. (2004). VEGF selectively induces Down syndrome critical region 1 gene expression in endothelial cells: a mechanism for feedback regulation of angiogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 321, 648-656.
- Yeromin, A. V., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2004). A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells. *J Gen Physiol* 123, 167-182.
- Youn, H. D., Chatila, T. A., and Liu, J. O. (2000). Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *Embo J* 19, 4323-4331.
- Youn, H. D., and Liu, J. O. (2000). Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity* 13, 85-94.
- Youn, H. D., Sun, L., Prywes, R., and Liu, J. O. (1999). Apoptosis of T cells mediated by Ca<sup>2+</sup>-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 286, 790-793.
- Yu, H., Sliedregt-Bol, K., Overkleeft, H., van der Marel, G. A., van Berkel, T. J., and Biessen, E. A. (2006). Therapeutic potential of a synthetic peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells as antirestenotic agent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1531-1537.

- Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B. D., Miyakawa, T., Bear, M. F., and Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* *107*, 617-629.
- Zhang, B. W., Zimmer, G., Chen, J., Ladd, D., Li, E., Alt, F. W., Wiederrecht, G., Cryan, J., O'Neill, E. A., Seidman, C. E., *et al.* (1996). T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice. *J Exp Med* *183*, 413-420.
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9357-9362.
- Zitt, C., Strauss, B., Schwarz, E. C., Spaeth, N., Rast, G., Hatzelmann, A., and Hoth, M. (2004). Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* *279*, 12427-12437.