

TESIS DOCTORAL

**Identificación funcional de moléculas
inductoras de muerte celular:
Implicación del transportador
mitocondrial de fosfato en apoptosis**

Sonia Alcalá Sánchez

**Centro de Investigación de Cáncer
Universidad de Salamanca-CSIC**



2008



Dr. Felipe Xosé Pimentel Muños, Científico Titular del Cosejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro del Instituto Universitario de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Identificación funcional de moléculas inductoras de muerte celular: Implicación del transportador mitocondrial de fosfato en apoptosis**” presentado por **Dña. Sonia Alcalá Sánchez**, ha sido realizado bajo su dirección en el Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 18 de Abril de 2008.

Fdo: Dr. Felipe X. Pimentel Muños

VºBº: Dr Rogelio González Sarmiento
Catedrático y Director del
Departamento de Medicina
Tutor del presente trabajo de
doctorado

AGRADECIMIENTOS

Después de todos estos años de recorrido a través del mundo de la ciencia, repletos de buenos y no tan buenos momentos, de desarrollo tanto profesional como personal y de dudas respecto a si algún día alcanzaría esta meta, por fin puedo decir que he llegado, y sana y salva, que no es poco. Aunque por supuesto, no he llegado hasta aquí sola, muchas personas me han acompañado a lo largo de este camino y quiero poder agradecerles ahora su aportación a esta etapa de mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, Felipe Pimentel, por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto. Gracias por tu ayuda y dedicación sin la cual nunca podría haber llevado a cabo este trabajo.

A mis compañeros germanos por el día a día, por su compañerismo y amistad dentro y fuera del laboratorio. A Aarne por ser un incondicional del “frühstück”. A Martina, con la que he compartido en todo este recorrido risas y llantos, gracias por empujarme a seguir adelante. Y a Kathrin, gracias por escucharme y por sacarme una sonrisa en los peores momentos. Gracias por esas cañitas para desconectar y solucionar el mundo.

A Jose Pichel por su carácter abierto y sociable y también quiero dar las gracias a las personas que han pasado por el labo, especialmente a Nuri por integrarme desde el primer día como una más y por “sacarme de bares”. Y a Clari, porque sencillamente es un encanto.

Tampoco quiero olvidar al resto de gente del CIC que han convertido los pasillos y cuartos de cultivo en lugares donde compartir penas y alegrías: a David y los chicos del 20, a las niñas del 5, especialmente Lolilla por su paciencia, a Antonio del 2, Pablo de mantenimiento y a todos aquellos con los que en algún momento tuve la ocasión de compartir vivencias fuera del laboratorio.

A los amigos de Boston, especialmente a Julio y a Lebi, por hacerme más llevadera la distancia. A la “bitxo” Marina por todas las risas y “buen rollo” que me ha

transmitido. A las "Pichinas", porque espero que se repita otro "Ciudad Real" y a las madrileñas: Pilar, Mara y en especial a Bea, por ayudarme a confiar en mí misma y por ser una amiga con la que siempre se puede contar

A Heleniflower por aguantar a esta jeremías, por preocuparse siempre por mí y por ser una de las mejores amigas que me llevo de esta etapa.

A Cris que, aunque la he visto poco en estos años, nunca ha faltado a nuestra celebración de cumpleaños metalero y por sus aportaciones de "Bella Hortera".

A Max Pocoyó, por enseñarme que "las mitocondrias también tiene a alma", por aguantarme en los peores momentos y sacarme de más de un apuro, mil gracias (m/♪Descendent shades of night ♪\m/).

Y por supuesto a mi familia, por estar siempre ahí, por vuestra confianza y apoyo incondicional. Gracias por vuestro cariño y comprensión. No hay palabras suficientes para agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

Y para todos aquellos que me deje en el tintero, GRACIAS!

La financiación necesaria para la realización de esta tesis doctoral ha sido aportada por la Junta de Castilla y León a través de la concesión de una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador (2004-2008).

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>I. LA APOPTOSIS.....</i>	3
1. Cambios morfológicos y moleculares característicos de la apoptosis...	3
2. Vías apoptóticas y su regulación	4
3. Principales integrantes de las rutas de señalización apoptótica.....	5
3.1. Efectores esenciales de la apoptosis: las caspasas	5
3.2. Receptores de muerte: familia TNF-R.....	8
3.3. Proteínas adaptadoras	8
3.4. Familia Bcl-2	9
4. Vías apoptóticas.....	10
4.1. Vías apoptóticas extrínsecas o de receptores de muerte	11
4.2. Vías intrínsecas.....	12
5. Hipótesis del mecanismo de MOMP.....	15
5.1. PTP (permeability transition pore).....	15
5.2. MAC (mitochondrial apoptosis-inducing channel).....	16
5.3. Contribución de ambos mecanismos al mPT.....	18
6. Poro de transición de permeabilidad: composición y regulación	19
6.1. Papel en condiciones normales	19
6.2. Composición.....	20
6.3. Otras proteínas reguladoras del ptp.....	24
6.4. Regulación del ptp por proteínas de la familia bcl-2	26
<i>II. FORMAS ATÍPICAS DE MUERTE CELULAR.....</i>	28
1. Necrosis	28
2. Otros tipos de muerte celular programada (PCD).....	28
2.1. Proteasas no caspasas.....	29
2.2. Muerte celular autofágica (lisosomal o de tipo II).....	30
2.3. Paraptosis o muerte celular tipo III.....	32
2.4. Catástrofe mitótica.....	33

III. SCREENINGS FUNCIONALES.....	34
OBJETIVOS.....	37
RESULTADOS.....	41
I. SCREENING FUNCIONAL.....	43
1. Detección morfológica.....	43
2. Sistema de identificación funcional.....	44
2.1. Optimización del tamaño de los grupos	45
2.2. Sistema de clonaje por expresión	46
2.3. Confirmación de la muerte celular: marcaje con IP	49
3. Secuenciación y clasificación	50
3.1. Tabla 1. Lista de moléculas clonadas.	50
3.2. Mediadores apoptóticos clonados.....	57
4. Identificación de distintos tipos de muerte celular	59
4.1. Diferentes procesos de vacuolización.....	59
4.2. Inducción de autofagia por la expresión del clon MYM6	61
4.3. Implicación diferencial de las caspasas en las distintas modalidades de muerte celular.....	64
II. FAMILIA DE TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES.....	66
1. Localización subcelular de los transportadores.....	68
2. Capacidad de los transportadores para activar las rutas apoptóticas mitocondriales.....	70
2.1. Similitudes con ANT.....	70
2.2. La sobreexpresión de los transportadores induce apoptosis	71
2.3. Susceptibilidad de diferentes tipos celulares	72
2.4. Inducción de la vía apoptótica mitocondrial.....	73
2.5. Inducción de la salida de citocromo <i>c</i> mitocondrial por la sobreexpresión de los transportadores.....	74
2.6. La apoptosis inducida por los transportadores es inhibible por miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2.....	77
3. Implicación de los transportadores en el PTP	78

3.1.	Interacción entre los transportadores y ANT1 o VDAC1	78
3.2.	Estabilización de la interacción entre PiC y ANT1 en presencia de estaurosporina (STS)	81
3.3.	Relevancia del PiC en la apoptosis inducida por STS	83

DISCUSIÓN.....91

I. SCREENINGS FUNCIONALES DE ALTO RENDIMIENTO.....93

1.	Tipos de <i>screening</i> de alto rendimiento	94
1.1.	<i>Screenings</i> dominantes por ganancia de función.	94
1.2.	<i>Screenings</i> recesivos por pérdida de función.	95
1.3.	<i>Screenings</i> letales sintéticos.....	96
2.	Ventajas e inconvenientes del método de análisis utilizado.....	97
2.1.	Aplicaciones	100

II. CONTROVERSIA RESPECTO A LA COMPOSICIÓN DEL PTP..**101**

1.	El PTP y su composición.....	101
1.1.	Evidencias de que VDAC no es esencial para el PTP	102
1.2.	PTP en ausencia de CypD.....	103
1.3.	Evidencias de que ANT no es esencial para el PTP.....	104
2.	Evidencias que apoyan la participación de PiC en el PTP	105
3.	Papel descrito previamente de los transportadores en apoptosis ...	108
3.1.	Implicación de MTCH1 en apoptosis	108
3.2.	Papel apoptótico de MTCH2	108
3.3.	Papel de ANT3 en apoptosis.....	109

CONCLUSIONES.....111

MATERIALES Y MÉTODOS.....115

1.	Líneas celulares	117
1.1.	Generación de células HEK-293 estables resistentes a apoptosis	117
1.2.	Mantenimiento celular	118
2.	Reactivos	118

3.	Sistema de análisis de la genoteca de ADN complementario (ADNc)...	119
4.	Construcciones de ADN	120
5.	Transfecciones y transducciones retrovirales	121
5.1.	Transfecciones transitorias	121
5.2.	Transducciones mediante infecciones retrovirales	123
6.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida e Inmunodetecciones (<i>western-blot</i>)	124
7.	Coinmunoprecipitaciones	125
8.	Ensayos de muerte celular	128
8.1.	Aislamiento de fragmentos apoptóticos: escalera de degradación de ADN (<i>DNA ladder</i>).....	128
8.2.	Permeabilidad celular: marcaje con IP	129
8.3.	Tinción nuclear con DAPI.....	130
8.4.	Citometría de flujo: marcaje con Mitotracker	130
9.	Técnicas de microscopía.....	130
9.1.	Inmunofluorescencias.....	130
9.2.	Microscopía electrónica.....	132
10.	Estudios con ARN de interferencia (ARNi)	133
10.1.	Transfecciones con ARNi.....	133
10.2.	Protocolo de aislamiento de ARN	133
10.3.	Síntesis de ADNc a partir de ARN: RT-PCR	134
10.4.	Amplificación de ADNc mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	135
	BIBLIOGRAFÍA.....	137
	ABREVIATURAS.....	177
	ANEXO: PUBLICACIÓN.....	185

Introducción

I. LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada (*programmed cell death*, **PCD**) fue inicialmente descrita en 1972 por Kerr (Kerr et al, 1972), y constituye un proceso fisiológico que juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular de los organismos multicelulares (Prindull, 1995). Por ejemplo, durante el desarrollo se produce un exceso de células que la apoptosis es responsable de eliminar para mantener constante el número de células en cada tejido y contribuir a estructurar los órganos (Meier et al, 2000). De hecho, los primeros avances en la caracterización molecular del proceso de muerte apoptótica surgieron de los estudios genéticos en el nematodo *C. elegans*. La activación y regulación de la apoptosis en organismos superiores depende de los correspondientes homólogos a los encontrados en *C. elegans*, pero con un grado de complejidad mayor (Liu & Hengartner, 1999).

1. Cambios morfológicos y moleculares característicos de la apoptosis.

Durante la apoptosis, se dan una serie de cambios en la estructura celular que afecta dramáticamente a la morfología de la célula. Algunos de ellos son: la condensación de la cromatina nuclear, la reducción del tamaño celular y la aparición de protuberancias en la membrana plasmática, un proceso que ha sido denominado *blebbing* (Kerr et al, 1972) (Wyllie et al, 1980). Asimismo, la apoptosis cursa con una serie de procesos bioquímicos que le caracterizan, como por ejemplo la degradación del ADN nuclear, debido a la activación de endonucleasas que rompen los fragmentos internucleosomales de 80-200 pares de bases (Wyllie, 1980), o cambios en la distribución de la fosfatidíserina (PS) normalmente presente en la cara interna de la membrana plasmática, pero que durante la apoptosis se expone en la superficie celular (Fadok & Henson, 1998). Además, durante la apoptosis, la endonucleasa **CAD** (*caspase-activated DNase*) se libera de su inhibidor **iCAD** o DFF (*DNA fragmentation*

factor), al que está unida, gracias a que éste es procesado por las caspasas (principales efectoras de la apoptosis) permitiendo la liberación de la endonucleasa activa y provocando la característica rotura internucleosomal del ADN (Liu et al, 1997) (Enari et al, 1998) (Sakahira et al, 1998). Finalmente, el contenido celular se empaqueta en los denominados “cuerpos apoptóticos” que envían señales a sus células vecinas y a los macrófagos para ser reconocidas y fagocitadas. Una de estas señales es la **fosfatidilserina** que se expone en la superficie de la célula durante la apoptosis (Savill & Fadok, 2000).

2. Vías apoptóticas y su regulación

El fenómeno apoptótico se puede activar a partir de eventos iniciadores que se dan tanto en el exterior como en el interior celular. Así, se han descrito dos vías apoptóticas principales: la **vía extrínseca** o de receptores de muerte, y la **vía intrínseca** o mitocondrial (Green & Evan, 2002). Ambas rutas de señalización convergen, finalmente, en una maquinaria común constituida por una familia de cisteín proteasas llamadas **caspasas** que se consideran los efectores centrales del proceso apoptótico.

La apoptosis es un proceso altamente controlado. Cada paso en la cascada apoptótica está regulado por moléculas antiapoptóticas que reprimen la activación de la cascada señalizadora (Vogelstein & Kinzler, 2004). La proteína **Bcl-2** o la familia de proteínas **IAP** son ejemplos de este tipo de reguladores negativos.

La apoptosis es un proceso esencial para los organismos multicelulares que está implicado en un gran número de patologías. Así, su desregulación puede llevar a desordenes patológicos (Thompson, 1995), lo que la convierte en una diana potencial para el tratamiento de varias enfermedades. Un incremento en la apoptosis, puede estar asociado a enfermedades como la isquemia o trastornos neurodegenerativos. Por otro lado, una disminución de su activación, se relaciona frecuentemente con varios tipos de cáncer o enfermedades autoinmunes.

Una característica común de la mayoría de las células cancerígenas, es su resistencia adquirida a sufrir apoptosis, ya sea como consecuencia de un bloqueo en los sensores o en las cascadas de señalización apoptótica, como por ejemplo, mutaciones en el gen supresor de tumores, p53 (Hanahan & Weinberg, 2000), o por una sobreactivación de las señales de supervivencia celular debida a factores extracelulares como IGF-1/2 o IL-3 (Evan & Littlewood, 1998), señales intracelulares que provienen del gen Ras (Downward, 1998), por pérdida del supresor de tumores pTEN (Cantley & Neel, 1999) o sobreexpresión de inhibidores apoptóticos como Bcl-2 (Hockenbery et al, 1990) (Reed, 1998). De este modo, la identificación de moléculas que puedan activar de manera directa procesos de muerte en células tumorales, podría facilitar el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer (Cummins et al, 2004).

3. Principales integrantes de las rutas de señalización apoptótica

3.1. Efectores esenciales de la apoptosis: las caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas aspártico-específicas que actúan como reguladores críticos del proceso de muerte celular y constituyen la principal maquinaria apoptótica efectora (Thornberry & Lazebnik, 1998) (Alnemri et al, 1996).

La primera en descubrirse fue la enzima convertidora de interleuquina-1- β (ICE), conocida desde entonces como **caspasa-1**, responsable de la maduración de la pro-interleuquina-1- β convirtiéndola a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa.

La importancia de las caspasas como responsables de los procesos de apoptosis fue establecida por Robert Horvitz y sus colaboradores, al comprobar que el producto del gen *ced-3*, una cisteín-proteasa homóloga a ICE que se encuentra en *C. elegans*, estaba implicada en los procesos de muerte celular que se dan durante el desarrollo de dicho nematodo (Yuan et al, 1993). Además, esta proteína sobreexpresada en mamíferos era capaz de inducir por sí sola el proceso apoptótico (Miura et al, 1993).

Las caspasas son sintetizadas como formas inactivas. Así, todas ellas poseen un prodominio seguido de un dominio activo y otro inhibidor que, al escindirse por un proceso autocatalítico, convierte a la procaspasa en su forma activa. Estas enzimas finalmente activas son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades idénticas de aproximadamente 20 kDa (p20 o subunidad grande), y otras dos de alrededor de 10 kDa (p10 o subunidad pequeña) (Walker et al, 1994) (Wilson et al, 1994) (Rotonda et al, 1996).

Se han identificado hasta 14 caspasas en mamíferos, 11 de las cuales corresponderían a proteínas humanas (Alnemri et al, 1996) (Kumar & Lavin, 1996) (Nicholson & Thornberry, 1997) (**Figura 1**).

3.1.1. Tipos de caspasas

Las caspasas se pueden clasificar en tres grupos según su función:

- **Caspasas inflamatorias.** Este grupo incluye a las caspasas-1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14, que están implicadas en inflamación mediando la maduración de citoquinas pro-inflamatorias.
- **Caspasas apoptóticas iniciadoras.** Poseen largos prodominios que contienen un dominio efector de muerte (*death effector domain*, **DED**), como la caspasa-8 y -10; o un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (*caspase activation and recruitment domain*, **CARD**), como las caspasas-2 y -9; que median la interacción con moléculas adaptadoras localizadas corriente arriba. Estas caspasas iniciadoras procesan y activan a las proteasas efectoras (Nicholson & Thornberry, 1997).
- **Caspasas apoptóticas ejecutoras.** A este grupo pertenecen las caspasas-3, -6 y -7; y se caracterizan por la presencia de un prodominio corto. Proteolizan

múltiples sustratos celulares que desencadenan los cambios morfológicos y moleculares característicos de la apoptosis (Degterev et al, 2003).

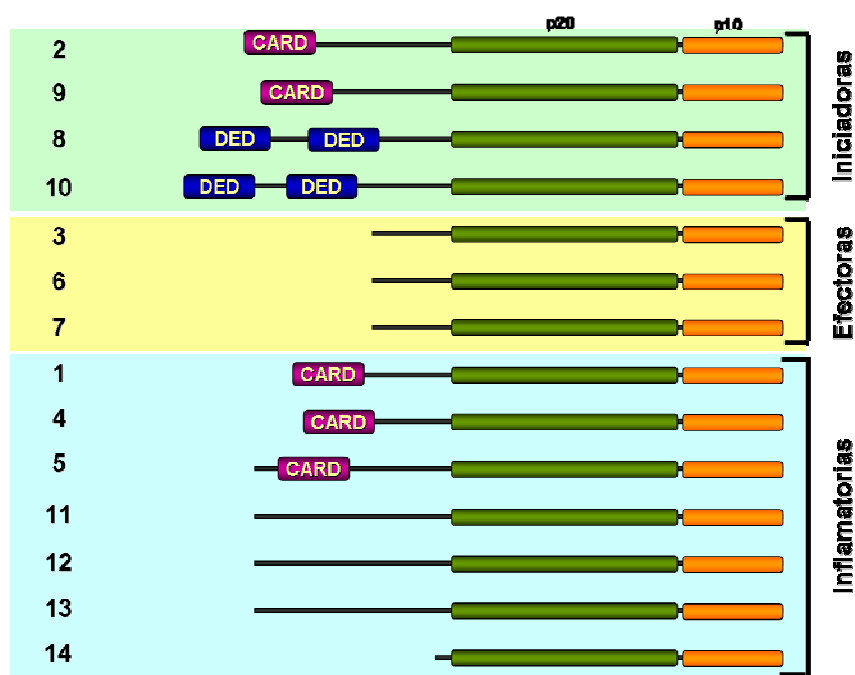


Figura 1. Familia de caspasas.

3.1.2. Inhibidores de caspasas

Las caspasas poseen una potente actividad proapoptótica que se debe mantener inhibida para que las células sanas puedan sobrevivir. Se han identificado muchos reguladores negativos de las caspasas, tanto en virus como en humanos. Algunos de estos inhibidores, tales como **crmA**, **p35**, **v-FLIP** e **IAPs**, han sido utilizados por los virus para evitar la apoptosis inducida por el hospedador como mecanismo de defensa (Irusta et al, 2003).

Las proteínas **IAPs** (del inglés *inhibitor apoptosis proteins*), se consideran los reguladores negativos de caspasas más importantes. Hasta la fecha, se han identificado ocho IAPs en humanos: incluyendo XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y Survivina. Estas proteínas son capaces de inhibir la apoptosis inducida por una gran variedad de

estímulos a través de una unión directa a ciertas **caspasas** y su consiguiente inhibición (LeBlanc, 2003). Todas las proteínas IAPs, contienen uno o varios dominios BIR (*baculovirus IAP repeat*) a través del cual directamente inhiben a las caspasas (Salvesen & Duckett, 2002). Los **IAPs** se pueden unir tanto a procaspasas como a caspasas activadas, bloqueando su procesamiento y su actividad. Un bloqueo de estas proteínas induce la activación de la apoptosis. Así, las proteínas proapoptóticas **Smac** (*second mitochondria-derived activator of caspases*) y **HtrA2/Omi**, que se liberan de la mitocondria bajo un estímulo apoptótico, promueven la activación de las caspasas inhibiendo a las proteínas IAPs (Suzuki et al, 2001) (Du et al, 2000).

3.2. Receptores de muerte: familia TNF-R

Los receptores de muerte se localizan en la superficie celular y pueden inducir proliferación, supervivencia, diferenciación o muerte, dependiendo de las señales que reciben (Nagata, 1997) (Ashkenazi & Dixit, 1998) (Wallach et al, 1998). Su función proapoptótica reside en la presencia de un dominio de muerte (*death domain, DD*) en la región intracelular, que es esencial para inducir apoptosis (Itoh & Nagata, 1993) (Tartaglia et al, 1993). Estos receptores, como TNF-R o CD95, se activan por un grupo de ligandos que están relacionados estructuralmente entre sí, y que pertenecen a la familia de ligandos **TNF** (factor de necrosis tumoral). Los miembros de la familia de receptores TNF (**TNF-R**) también pueden activar a NF- κ B y Jun quinasa (JNK).

3.3. Proteínas adaptadoras

Las proteínas adaptadoras conectan los receptores de muerte con las caspasas y con miembros de la familia Bcl-2. Estas asociaciones entre proteínas adaptadoras, caspasas y receptores como los miembros de la familia TNF-R, están característicamente mediadas por el dominio de muerte (**DD**), el dominio efector de muerte (**DED**) y el dominio de reclutamiento de caspasas (**CARD**) (Ashkenazi & Dixit,

1998) (Hofmann et al, 1997). El **DD** se encuentra en la región citoplasmática de muchos de los receptores de la familia **TNF-R**, así como en las moléculas adaptadoras, tales como **FADD/MORT1** (*Fas-associated death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity*), **TRADD** (*TNF-R1-associated death domain protein*), y **RIP** (*receptor-interacting protein*). La interacción entre los **DD** del receptor y el adaptador, permite el reclutamiento y agregación de las caspasas (mediado por los dominios **DED** y **CARD** de la molécula adaptadora) y su consecuente activación (Boldin et al, 1995) (Chinnaiyan et al, 1995) (Medema et al, 1997) (Kischkel et al, 1995).

3.4. Familia Bcl-2

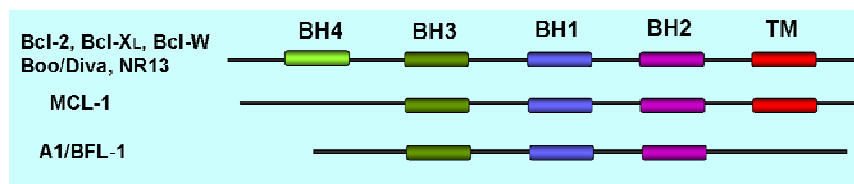
Todos los miembros de esta familia contienen al menos uno de los cuatro dominios homólogos relativamente conservados **BH** (*Bcl-2 homology*). Hay alrededor de 20 miembros de esta familia Bcl-2, y pueden ser divididos en tres grupos (**Figura 2**).

- En primer lugar los miembros **antiapoptóticos**, que incluyen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1, Mcl-1, Boo/Diva y NR13, promueven la supervivencia celular. Se caracterizan en su mayoría por contener cuatro dominios **BH**: BH1, BH2, BH3 y BH4.
- Las proteínas **proapoptóticas** inducen muerte celular y se dividen en 2 grupos:
 - Los miembros “**multidominio-BH**” Bax, Bak y Bok, que comparten tres dominios (BH1, BH2 y BH3) con Bcl-2. También pertenece a este grupo la proteína Bcl-X_S que contiene los dominios BH3 y BH4.
 - El grupo **BH3-only**, del que se conocen varios miembros entre los cuales se encuentran Bid, Bad y Bim. Poseen sólo el dominio BH3, que es necesario y, probablemente, suficiente para la inducción de apoptosis. Se localizan por encima de Bak y Bax en la cascada apoptótica, puesto que no son capaces de inducir apoptosis en

células que carecen de ambas proteínas (Zong et al, 2001) (Cheng et al, 2001).

Ambos grupos proapoptóticos, parecen ser necesarios para lanzar el proceso de muerte celular inducido por la vía intrínseca.

Antiapoptóticas



Proapoptóticas

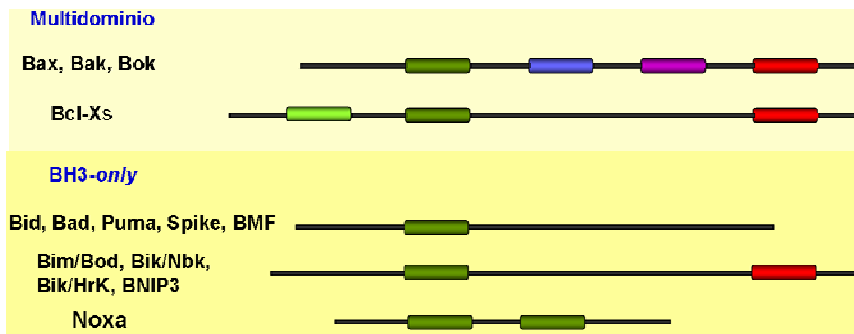


Figura 2. La familia Bcl-2

4. Vías apoptóticas

Como ya se ha comentado, existen 2 rutas apoptóticas principales: la **vía extrínseca** o de receptores de muerte y la **vía intrínseca** o mitocondrial. (Strasser et al, 2000) (Figura 3).

En mamíferos, hay un gran número de señales que pueden inducir ambas rutas.

Las vías **extrínsecas** se activan por estímulos apoptóticos externos a la célula, y se inician por la unión de ligandos inductores de muerte a sus receptores localizados en la superficie celular.

En otras ocasiones, la apoptosis se inicia por señales **intrínsecas** tales como daño en el ADN inducido por radiaciones o agentes químicos; privación de factores de crecimiento, o estrés oxidativo. Generalmente, estas señales del interior celular, inician la vía apoptótica intrínseca, en la que está implicada de un modo central la mitocondria (Green et al, 2004).

Tanto las vías extrínsecas como las intrínsecas, **convergen** en las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) que, a su vez, activan a otras proteasas y nucleasas que se encuentran por debajo en la cascada de señalización, dando lugar, finalmente, a las alteraciones morfológicas y moleculares características del proceso apoptótico.

4.1. Vías apoptóticas extrínsecas o de receptores de muerte

Las vías extrínsecas están mediada por receptores de muerte tales como **Fas** (CD95, *cytotoxicity-dependent protein 95*, o APO-1, *apoptosis-1 protein*), el receptor del factor de necrosis tumoral, **TNFR**, o los receptores **TRAIL**. Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores TNF y están implicados de forma fundamental en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria.

Los receptores de muerte, interaccionan a través de su dominio citoplasmático de muerte (DD), con el DD homólogo que se localiza en las proteínas adaptadoras citosólicas como **TRADD** (*TNF receptor-associated death domain protein*) o **FADD** (*Fas associated death domain protein*). Estas moléculas adaptadoras, comunican, los receptores de muerte, con las caspasas, y con miembros de la familia Bcl-2, a través del dominio de muerte (DD), el dominio efector de muerte (*death effector domain*, DED), y el dominio de reclutamiento de la caspasa (*caspase recruitment domain*, CARD) (Ashkenazi & Dixit, 1998) (Hofmann et al, 1997).

La señalización por **Fas** es uno de los casos mejor caracterizados. La estimulación por el ligando de muerte, en este caso **FasL**, resulta en una oligomerización de su correspondiente receptor, **Fas**, y el reclutamiento de su proteína adaptadora homóloga, **FADD** a través de los DDs de ambas moléculas. Como consecuencia de la agregación de FADD, su DED interacciona con el dominio

homólogo de la **procaspasa-8** (y en algunos casos la **-10**) formando el complejo de señalización inductor de muerte (**DISC**, *death-inducing signaling complex*). A partir de este punto, el proceso apoptótico puede seguir dos rutas alternativas: una implica la activación directa de otras caspasas (en **células de tipo 1**), mientras que en la otra (**células de tipo 2**) se requiere la intervención de la mitocondria, convergiendo por tanto con la ya mencionada vía apoptótica intrínseca o mitocondrial.

En las **células de tipo 1**, la autoactivación de la caspasa-8 (o la -10) en el DISC, va seguida de la activación de **caspasas efectoras**, incluyendo **caspasa-3**, **-6** y **-7**, que actúan como efectores corriente abajo del programa de muerte celular (Ashkenazi & Dixit, 1998).

En las **células tipo 2**, se da una interacción entre las vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, mediada por la proteína BH3-only, **Bid** (Li et al, 1998). Esta proteína, reside en el citosol como un precursor inactivo, pero después de la activación de la vía extrínseca, es procesado por la **caspasa-8** para producir un fragmento C-terminal de 15kDa, **t-Bid**, que se transloca a la mitocondria y facilita la activación, inserción y oligomerización de **Bax** en la membrana mitocondrial externa. En este contexto, **Bax** permite la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, formando un canal que algunos autores han denominado **MAC** (*mitochondrial apoptosis-inducing channel*) y que se describe posteriormente (Cho & Choi, 2002) (Fan et al, 2005) (Nagata, 1997) (Scaffidi et al, 1999).

4.2. Vías intrínsecas

Las **vías intrínsecas**, se inician por diversos estímulos apoptóticos que provienen del interior celular y convergen en la mitocondria. La **mitocondria**, además de ser un importante orgánulo para la producción de energía y la homeostasis de Ca^{2+} , participa en muerte celular como regulador central de las vías apoptóticas intrínsecas. La permeabilización de su membrana externa (**MOMP**, *mitochondrial outer membrane*

permeabilization) es un evento crucial en estas vías (Desagher & Martinou, 2000) (Tsujimoto, 2003) y está principalmente mediado y controlado por miembros de la familia **Bcl-2** (Tsujimoto, 2003) (Adams & Cory, 2001). Una vez se induce la **MOMP**, se precipita el proceso de muerte celular a través de la liberación de moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana (Green & Kroemer, 2004) (Green & Reed, 1998).

Entre los **factores apoptogénicos** que se liberan al citosol, se incluyen el **citocromo c** (Kluck et al, 1997) (Yang et al, 1997), un componente de la cadena de transporte electrónico (Green & Reed, 1998), **HtrA2/Omi**, una serín proteasa mitocondrial, **Smac/Diablo** (*Second mitochondria derived activator of caspase*,(Verhagen et al, 2000)), **AIF** (*Apoptosis Inducing Factor*,(Joza et al, 2001)) (Susin et al, 1999) y la **endonucleasa G** (Parrish et al, 2001). **AIF** se transloca al núcleo, donde desencadena cambios nucleares independientes de caspasas (Daugas et al, 2000), causando condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN (Susin et al, 1999). La **endonucleasa G** induce fragmentación del ADN internucleosomal, también de un modo independiente de la activación de las caspasas (Enari et al, 1998) (Li et al, 2001). **Smac/Diablo** activa apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibitoras de apoptosis, las proteínas **IAPs**. **HtrA2/Omi** también actúa uniéndose a las proteínas **IAP** e inhibiendo su acción.

4.2.1. Liberación de citocromo c

La salida de **citocromo c** de la mitocondria, se considera como el punto de no retorno del proceso apoptótico. Una vez liberado, el citocromo c citosólico se une a la proteína **Apaf-1** (*apoptosis protease-activating factor 1*) aumentando la afinidad de ésta por el **ATP** (Jiang & Wang, 2000). La unión del nucleótido al complejo formado por **Apaf-1** y **citocromo c**, induce la oligomerización de **Apaf-1** (Zou et al, 1999) cuyo dominio **CARD** queda expuesto provocando el reclutamiento de la **procaspasa-9** y la formación del complejo proteico llamado “**apoptosoma**”. Dentro del apoptosoma, se

activa la **caspara-9**, permitiendo el procesamiento de la caspara ejecutora **caspara-3** (Shi, 2002) que procesa a su vez importantes sustratos intracelulares.

Estas rutas dependientes de caspasas actúan conjuntamente con la señalización independiente de estas proteasas (por ejemplo mediante **endonucleasa G**), para producir las alteraciones celulares típicas del proceso apoptótico ya comentadas, como la condensación de la cromatina, fragmentación de ADN, cambios en la membrana plasmática o la exposición de la fosfatidíserina en la superficie celular, para finalmente acabar con la muerte de la célula.

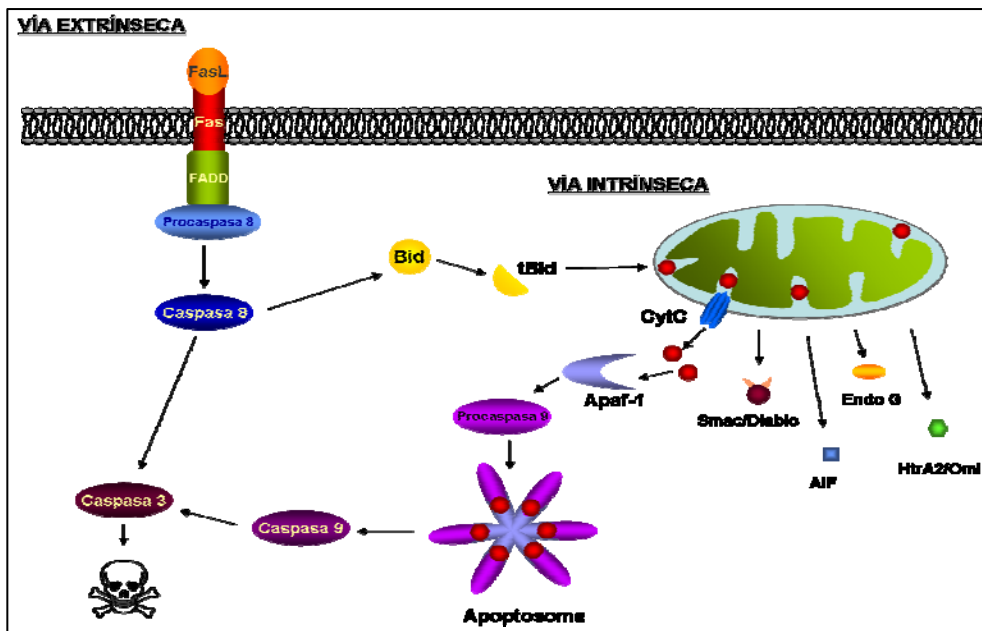


Figura 3. Vías apoptóticas

5. Hipótesis del mecanismo de MOMP

Aunque está bastante establecido que la permeabilización de la membrana mitocondrial externa es un evento crucial en las vías apoptóticas intrínsecas, el mecanismo detallado que subyace a este fenómeno, y cómo este proceso está regulado por moléculas de la familia **Bcl-2**, aún están por determinar. De hecho, existe una controversia acerca del modo en el que se produce esta permeabilización y sobre cómo se liberan las proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana al citosol. En este sentido, se han propuesto dos mecanismos posibles que implican la apertura de 2 canales mitocondriales diferentes: el poro de transición de permeabilidad (**PTP**), en la membrana mitocondrial interna, y el canal mitocondrial inducido por apoptosis (**MAC**, *mitochondrial apoptosis-inducing channel*) en la membrana mitocondrial externa (Kinnally & Antonsson, 2007) (**Figura X**).

5.1. PTP (Poro de Transición de Permeabilidad)

Este modelo se desarrolló inicialmente para explicar el fenómeno de transición de permeabilidad en la membrana mitocondrial interna, **MPT** (*mitochondrial permeability transition*) (Kroemer et al, 1995) que tiene lugar en algunas condiciones fisiológicas y que frecuentemente correlaciona con la apoptosis. Este proceso consiste en un incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a solutos de masa molecular hasta 1500Da, lo que resulta en un desequilibrio en el gradiente de protones (Vinogradov et al, 1972) (Di Lisa et al, 2001), la disipación de potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Lemasters et al, 1998) y un movimiento de agua, iones y solutos a través de la membrana mitocondrial interna que resulta en una extensa dilatación de este compartimiento mitocondrial, debido la presión osmótica ejercida por las altas concentraciones de proteínas en su interior. Como consecuencia de esta expansión de la matriz, y de acuerdo con esta hipótesis, se producirían rupturas locales en la membrana mitocondrial externa (Vander Heiden et al, 1997) (Zoratti & Szabo, 1995) (Halestrap et al, 2002) permitiendo la liberación al citosol de proteínas proapoptóticas solubles del espacio intermembrana (Kroemer & Reed, 2000).

Aunque el mecanismo de **MPT** aún no está completamente establecido, está ampliamente aceptado que uno de los fenómenos que lo provocan es la apertura de un canal inespecífico de alta conductancia llamado poro de transición de permeabilidad, **PTP** (Marzo et al, 1998b) (Marzo et al, 1998a) que es dependiente de voltaje y de calcio, y sensible a **ciclosporina A** (Bernardi et al, 1999) (Crompton, 1999) (Bernardi et al, 2006).

Las moléculas que se han considerado como componentes esenciales del poro son: **VDAC** (canal aniónico dependiente de voltaje), **ANT** (transportador del nucleótido adenina) y **CypD** (ciclofilina D, una peptidil prolil-cis, trans-isomerasa mitocondrial), aunque el papel de **VDAC** y **ANT** ha sido puesto en duda recientemente (Kokoszka et al, 2004) (Baines et al, 2007).

5.2. **MAC (mitochondrial apoptosis-inducing channel)**

Se ha visto que la liberación de **citocromo c** puede ocurrir también conservando el potencial de membrana intacto y sin pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial externa (von Ahsen et al, 2000) (Eskes et al, 2000). Estas observaciones indican que, además de la ruptura propuesta en el mecanismo del **PTP**, está operando un mecanismo de permeabilización más selectivo que implica la formación de un poro exclusivamente en la membrana mitocondrial externa: el **MAC** (Liu et al, 1996) (De Giorgi et al, 2002) (Dejean et al, 2005) (Guo et al, 2004) (Pavlov et al, 2001) (Wei et al, 2001). Este canal se forma durante los primeros momentos del proceso apoptótico y proporcionaría directamente poros lo suficientemente grandes como para permitir la liberación al citosol de proteínas intermembrana de hasta 15 kDa, como el **citocromo c** (14 kDa).

Se ha visto que algunas proteínas de la familia **Bcl-2** (como **Bcl-X_L**) (Green & Reed, 1998) muestran similitud estructural con determinadas proteínas formadoras de poros (como las colicinas o la toxina diftérica) que algunas bacterias utilizan como

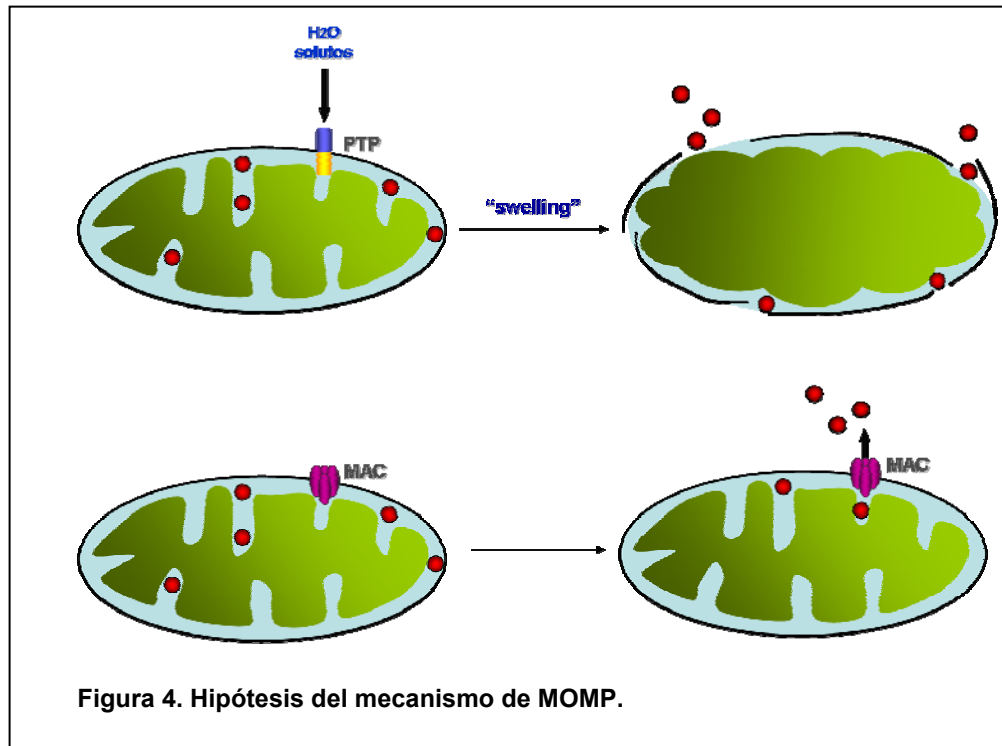
mecanismo de defensa. De hecho, se ha visto que tanto **Bcl-X_L** como **Bcl-2** y **Bax**, pueden formar canales iónicos cuando se añaden y oligomerizan en membranas lipídicas sintéticas (Minn et al, 1997) (Schendel et al, 1997) (Antonsson et al, 1997) (Schlesinger et al, 1997). Por ejemplo, cuando se añade **Bax** a liposomas, éste puede insertarse en la membrana, oligomerizar, presumiblemente en tetrámeros, y formar canales que permiten la salida de **citocromo c** (Saito et al, 2000). Además, las características electrofisiológicas de **MAC** son muy similares a estos canales formados por **Bax**, y la depleción de esta proteína proapoptótica disminuye significativamente la actividad del canal **MAC**, por lo que se ha sugerido que **Bax** podría ser un constituyente esencial de este canal en algunos sistemas. Asimismo, debido a la redundancia funcional que se observó entre **Bax** y otro miembro de la familia Bcl-2, la proteína **Bak**, con respecto a su participación en el **MAC**, se han propuesto ambas proteínas proapoptóticas como los componentes putativos del canal (Dejean et al, 2006a) (Dejean et al, 2006b) (Martinez-Caballero et al, 2005) (Dejean et al, 2005) (Guo et al, 2004) (Martinez-Caballero et al, 2004) (Saito et al, 2000).

5.2.1. Formación del poro a través de Bax o Bak

Bax reside normalmente en el citosol de células sanas como monómero inactivo pero, bajo un estímulo apoptótico, migra a la mitocondria a través de un mecanismo que aún no está claro. Parece ser que, en asociación con la mitocondria, **Bax** sufre un cambio conformacional (Nechushtan et al, 1999) que promueve su oligomerización (Antonsson et al, 2001). La presencia de **tBid** en la mitocondria, puede favorecer la inserción y oligomerización de **Bax** (Eskes et al, 2000) y también **Bak** (Wei et al, 2000), los cuales podrían formar poros independientemente de **ANT** o **VDAC** para, finalmente, permitir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Además, se ha visto que las proteínas BH3-only **Bid** y **Bik**, añadidas a mitocondrias aisladas, provocan una permeabilización de la membrana mitocondrial externa que no se ve afectada por inhibidores del **PTP** (Shimizu & Tsujimoto, 2000) sugiriendo que las proteínas de la familia **Bcl-2** pueden formar poros inespecíficos sin necesidad de interactuar funcionalmente con miembros del **PTP**.

5.3. Contribución de ambos mecanismos al MPT

La apertura del **PTP** y **MAC** se puede dar aisladamente o en combinación, y ambos están sujetos a intensa regulación por las proteínas de la familia **Bcl-2** (Dejean et al, 2005) (Guo et al, 2004) (Murphy et al, 2001) (Murphy et al, 1996). Además, estos dos canales se pueden diferenciar por su respuesta a inhibidores como, por ejemplo, la **ciclosporina A**, que muestra capacidad para bloquear el **PTP** pero no el **MAC** (Broekemeier & Pfeiffer, 1989). Al contrario, **bci1** (*Bax channel inhibitor*), un compuesto que se identificó en un *screening* diseñado para clonar moléculas de bajo peso molecular con actividad inhibidora de los canales formados por Bax (Hetz et al, 2005), es capaz de bloquear **MAC** pero no afecta a **PTP** (Hetz et al, 2005). Una posible explicación para la existencia de ambos canales sería que, a concentraciones fisiológicas, las proteínas de la familia **Bcl-2** actuarían por sus efectos específicos sobre el **PTP**, modulando la probabilidad de que se forme este canal. Pero, a altas concentraciones, podrían oligomerizar y tener efectos autónomos. Estas dos rutas, se podrían dar alternativamente en función de la abundancia local de los componentes del **PTP**, sus isoformas, y los inhibidores o activadores presentes en diferentes situaciones fisiológicas (Zamzami & Kroemer, 2001).



6. Poro de transición de permeabilidad: composición y regulación

6.1. Papel en condiciones normales

El **PTP** o **PTPC** (*permeability transition pore complex*), es un complejo multiproteico que se localiza en los sitios de unión entre la membrana mitocondrial externa y la interna. Este poro es capaz de controlar la homeostasis mitocondrial favoreciendo, si es necesario, un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones, agua y solutos de masa molecular menor de 1500 Da, permitiendo un balance entre la composición y el estado de la matriz y el

citósol. Por ejemplo, puede participar en la homeostásis de Ca^{2+} mitocondrial, en el mantenimiento del pH y el potencial transmembrana o en el control del volumen celular (Crompton, 1999; Kroemer, 1999).

6.2. Composición

En la actualidad hay un intenso debate abierto acerca la composición molecular del **PTP**. Como ya se ha comentado, clásicamente se ha considerado que está compuesto por el canal aniónico dependiente de voltaje (**VDAC**), que se localiza en la membrana mitocondrial externa (Colombini, 2004) (Shoshan-Barmatz et al, 2006) y el transportador del nucleótido adenina (**ANT**), en la membrana mitocondrial interna (Belzacq et al, 2002). Ambas son las proteínas más abundantes en la membrana mitocondrial externa e interna, respectivamente. Un tercer componente sería **ciclofilina D**, localizada en la matriz mitocondrial (Crompton, 2003).

6.2.1. ANT

Esta proteína es el miembro prototípico de la familia de transportadores mitocondriales, y tiene una estructura muy conservada, con tres dominios homólogos (Palmieri, 2004). Existen dos isoformas de ANT en ratón (ANT1 y ANT2) y 3 en humanos, codificadas por diferentes genes (**ANT1**, **ANT2**, **ANT3**), aunque recientemente se ha identificado un nuevo miembro tanto en humanos como en ratones, el **ANT4** (Dolce et al, 2005) (Brower et al, 2007) (Rodic et al, 2005) (Kim et al, 2007). En humanos, **ANT1** se expresa específicamente en el corazón, músculo esquelético y, en menor medida, en el cerebro (Lunardi & Attardi, 1991) (Stepien et al, 1992). La expresión de **ANT2** es dependiente del crecimiento (Battini et al, 1987), y es un marcador de proliferación celular (Barath et al, 1999) que se expresa muy débilmente en todos los tejidos adultos (Stepien et al, 1992). **ANT3** es ubicuo y sus niveles de expresión se correlacionan con la actividad respiratoria del tejido (Stepien

et al, 1992). **ANT4** está presente únicamente en hígado, testículo y cerebro (Dolce et al, 2005). **ANT** parece actuar como una **proteína bifuncional**. Por un lado, en condiciones fisiológicas, contribuye con un paso crucial para el metabolismo energético aeróbico: la translocación de ADP/ATP. ANT cataliza el importe desde el citosol de ADP y el exporte a la matriz del ATP sintetizado durante el metabolismo energético aeróbico por la F_0-F_1 ATPasa. Sin embargo, por otro lado, se puede convertir en un poro proapoptótico no específico, bajo el control de proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Belzacq et al, 2002).

- **Evidencias de la implicación del ANT en el PTP**

El **PTP** está fuertemente modulado por ligandos del **ANT** indicando que este transportador participa efectivamente en el poro. Uno de estos ligando que actúa como regulador positivo del **PTP** es el **atractilato** (o **atractilósido**), un glucósido tóxico de origen vegetal que impide la transferencia de ADP y ATP a través de la membrana mitocondrial e inhibe la fosforilación oxidativa favoreciendo la apertura del poro (Halestrap & Davidson, 1990) (Marzo et al, 1998a). Entre los ligandos de **ANT** que inhiben la apertura del **PTP** se encuentran el **ácido bongcrékico (BA)** y los nucleótidos de adenina (Haworth & Hunter, 1980) (Haworth & Hunter, 2000). Además, mediante experimentos de cromatografía con extractos mitocondriales eluidos por una columna de afinidad de **CypD**, se han purificado las proteínas **VDAC** y **ANT** (Crompton et al, 1998) indicando que efectivamente los tres pueden formar un complejo macromolecular. También se ha visto que la sobreexpresión de **ANT1** y **ANT3**, pero no la de **ANT2**, activa el **PTP** e induce apoptosis en algunos tipos celulares (Bauer et al, 1999) (Zamora et al, 2004).

Todos estos datos son consistentes con una participación de **ANT** en el **PTP**, y llevaron a proponer a este transportador como componente estructural del poro. Sin embargo, recientes estudios con ratones deficientes para **ANT** señalan a que éste pudiera no ser un componente esencial del **PTP**, dado que las mitocondrias de ratones deficientes en **ANT** aún son capaces de sufrir **MPT**, aunque se incrementa la cantidad de Ca^{2+} necesaria para activarla (Kokoszka et al, 2004). Por ello, diversos autores apuntan a la existencia de otros transportadores mitocondriales menos abundantes que pudieran estar supliendo la ausencia de **ANT** en este sistema y, en

este contexto, sería interesante identificar otros canales en la membrana mitocondrial interna que pudieran estar directamente implicados en el **PTP**.

6.2.2. VDAC

Esta proteína es una porina de la que se conocen tres isoformas en mamíferos (**VDAC1**, **2** y **3**), y forma un canal a través de la membrana mitocondrial externa (Shoshan-Barmatz & Israelson, 2005). Este canal permite la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas y participa en la regulación del volumen celular. Su participación en el **PTP** se ha establecido sobre la base de diversas aproximaciones:

- Las propiedades electrofisiológicas del **PTP** son altamente similares a las de **VDAC** incorporado en membranas lipídicas (Szabo et al, 1993; Szabo & Zoratti, 1993).
- Varios factores que alteran las propiedades del canal **VDAC**, como NADH, Ca^{2+} , o glutamato, así como la unión de **hexoquinasa II** (Zizi et al, 1994) (Gincel et al, 2001) (Gincel & Shoshan-Barmatz, 2004) (Pastorino et al, 2002), también modulan la actividad del **PTP** (Costantini et al, 1996) (Fontaine et al, 1998) (Pastorino & Hoek, 2003).
- La cromatografía de extractos mitocondriales en una columna de afinidad de **Cyp D**, otro de los considerados como componentes esenciales del **PTP**, permite la co-purificación de **VDAC** asociado a **ANT** (Crompton et al, 1998).
- Estudios utilizando 2 anticuerpos policlonales contra **VDAC** que reconocían diferentes epítomos del canal (Shimizu et al, 2001) mostraron que la presencia de estos anticuerpos podía inhibir la actividad del **PTP** reconstituido en liposomas (Shimizu et al, 2001). Ambos anticuerpos también inhibían el **PTP** inducido por Ca^{2+} (Shimizu et al, 2001), de nuevo indicando un papel crucial de **VDAC** en el **PTP**.
- Se ha visto que las proteínas antiapoptóticas, **Bcl-2** y **Bcl-X_L**, bloquean el **PTP** directamente inhibiendo la actividad de **VDAC** (Tsujimoto et al, 2006).

Aunque todos estos datos sugieren la participación de **VDAC** en el **PTP**, recientes estudios en ratones nulos para la porina parecen indicar que podría no ser un componente esencial (Baines et al, 2007).

6.2.3. Ciclofilina D (Cyp D)

Esta proteína es un miembro mitocondrial de la familia de las ciclofilinas que muestran actividad peptidil prolil-cis trans-isomerasa (PPlasa) y tiene un papel crucial en el plegamiento de proteínas (Galat & Metcalfe, 1995). La CypD reside en la matriz mitocondrial (Johnson et al, 1999), aunque se asocia con la membrana mitocondrial interna durante el fenómeno de transición de permeabilidad.

El supuesto papel de **CypD** en la regulación del **MPT**, está basado en la observación de que la ciclosporina A (**CsA**), un inhibidor específico de la familia de ciclofilinas que actúa impidiendo su actividad PPlasa, bloquea el **PTP** (Broekemeier et al, 1989) y, además, bloquea a la **CypD** en el mismo rango de concentraciones que desensibilizan al **PTP** (Halestrap & Davidson, 1990) (McGuinness et al, 1990) (Griffiths & Halestrap, 1991). El mecanismo que se ha sugerido para esta inhibición del **PTP** por **CsA** a través de **CypD** se basa en una interacción con el **ANT**. La **CypD** se une al **ANT** a través de su sitio activo PPlasa, induciendo en el transportador un cambio conformacional y provocando el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna. La **CsA** actúa ocluyendo el sitio activo de la **CypD** y bloqueando su unión al **ANT** (Woodfield et al, 1998). Además, se ha observado que el complejo **ANT/VDAC** parece tener una afinidad mucho mayor por la **CypD** que ambas moléculas por separado. Además, también parece actuar modulando la afinidad del **PTP** por el Ca^{2+} (McGuinness et al, 1990) (Bernardi, 1992).

Recientemente han sido generados **ratones deficientes** para el gen de la **CypD** (Nakagawa et al, 2005) (Baines et al, 2005) (Basso et al, 2005) (Schinzel et al, 2005). Las mitocondrias aisladas del hígado de estos ratones, no sufren **MPT** en respuesta a varios inductores apoptóticos como atractilósido y H_2O_2 , y acumulan tasas mucho mayores de Ca^{2+} que las mitocondrias normales (Nakagawa et al, 2005) (Schinzel et al, 2005). Sin embargo, la eliminación de **CypD**, únicamente incrementaba la cantidad de Ca^{2+} necesaria para abrir el **PTP** (Nakagawa et al, 2005) (Basso et al, 2005) y

éste, se volvía insensible a los efectos de la **CsA**. De estos resultados, se puede concluir que la **CypD** está implicada específicamente en el **MPT** sensible a **CsA**, actuando como diana del inhibidor dentro del poro y modulando además la sensibilidad del **PTP** al Ca^{2+} (Basso et al, 2005).

6.3. Otras proteínas reguladoras del PTP

Existen algunas proteínas adicionales que pueden jugar un papel regulador en el **PTP**, pero no se consideran parte del mismo. Éstas son, aparte de los miembros tanto proapoptóticos como antiapoptóticos de la **familia Bcl-2** (Henry-Mowatt et al, 2004) (Sharpe et al, 2004), principalmente las siguientes:

6.3.1. Hexoquinasa mitocondrial (HK_m)

Esta proteína cataliza el primer paso de la glucólisis empleando ATP para convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato. **HK_m** está asociada al lado citosólico de la membrana mitocondrial externa (Robey & Hay, 2006) (Kokoszka et al, 2004) y presenta dos isoformas en mamíferos, **HKI** y **HKII**, que se encuentran sobreexpresadas en algunos tumores (Shinohara et al, 1991) (Rempel et al, 1996) (Azoulay-Zohar et al, 2004). Se ha visto que la **HK** participa en la regulación de la apoptosis interaccionando con las proteínas de **PTP** (Beutner et al, 1998) y, de hecho, se ha demostrado que se une específicamente a **VDAC1** (Wilson, 1995) con un efecto bloqueador del poro. En un sistema reconstituido, incrementos de la asociación entre **HK** y **VDAC** se correlacionan con el cierre del **PTP** y *viceversa* (Beutner et al, 1998). También se ha visto que la **HK** previene la actividad apoptogénica de **Bax** bloqueando su acceso al **PTP**, de modo que **Bax** tiene acceso a **VDAC** y puede activar al **PTP** sólo cuando **HK** se disocia de **VDAC** (Pastorino et al, 2002) (Majewski et al, 2004).

6.3.2. Creatín quinasa mitocondrial (CK_m)

La creatín quinasa, también conocida como fosfocreatín quinasa o creatín fosfoquinasa (CPK), es una enzima que se expresa en múltiples tejidos. Cataliza la conversión de creatina a fosfocreatina consumiendo ATP y generando ADP. Existen dos isoformas mitocondriales (**CK_m**) que se localizan en el espacio intermembrana y producen ATP mediante la reacción inversa al resto de creatín quinasas. Esta proteína ha sido identificada como un inhibidor del **PTP** (Schubert & Grimm, 2004), y se encuentra sobreexpresada en varios tumores (DeLuca et al, 1981) (Pratt et al, 1987) (Baines et al, 2005) (Nakagawa et al, 2005). Además, se ha visto que se une al complejo **ANT/VDAC** en el espacio intermembrana (O'Gorman et al, 1997).

6.3.3. Receptor periférico de la benzodiazepina (PBR)

Esta molécula se localiza en la membrana mitocondrial externa y promueve el transporte de colesterol hacia la matriz durante la esteroidogénesis (Bernardi et al, 2006), actuando como un canal translocador (Papadopoulos et al, 2006). Aunque el **PBR** fue inicialmente identificado como sitio de unión de la benzodiazepina, se ha visto que es diferente del receptor central de benzodiazepina (CBR) en términos de estructura, localización subcelular, distribución tisular y función fisiológica. Conforme a estos datos y basándose en su función transportadora del colesterol, esta molécula ha sido renombrada como proteína translocadora (*translocator protein*, **TSPO**) (Papadopoulos et al, 2006), de la que se ha descrito su participación en respuestas inflamatorias y en apoptosis (Papadopoulos et al, 1999). Además, esta proteína se encuentra sobreexpresada en un gran número de tejidos neoplásicos y de líneas celulares tumorales (Hardwick et al, 1999) (Katz et al, 1990) (Miettinen et al, 1995) (Venturini et al, 1998). Algunos ligandos de **PBR** pueden regular el **PTP** llevando a cabo una acción proapoptótica, como **PK11195** (Hirsch et al, 1998), o antiapoptótica, como **Ro5-4864** (Bono et al, 1999). Estos datos indican que el **PBR** estaría implicado en la regulación del **PTP** en respuesta a señales inductoras de apoptosis (Casellas et al, 2002).

6.4. Regulación del PTP por proteínas de la familia Bcl-2

Existen numerosas evidencias de la regulación que ejercen las proteínas de la familia **Bcl-2** sobre el **PTP**.

6.4.1. Interacciones con ANT

Mediante experimentos de co-purificación, co-inmunoprecipitación y el uso del sistema de dos híbridos en levadura, se demostró la existencia de interacciones directas entre el **ANT** y los miembros de la familia Bcl-2: **Bcl-X_L**, **Bcl-2**, **Bax** y **Bak** (Marzo et al, 1998b). La interacción de **Bax** con **ANT** favorece la formación de un poro inespecífico que se ve inhibido por el ácido bongcrékico (**BA**) y la ciclosporina A (**CsA**), dos inhibidores conocidos del **PTP**. Además, se ha observado que la presencia de **Bax** en el **PTP**, es necesaria para una respuesta óptima al inductor apoptótico **atractilato** (Halestrap & Davidson, 1990) (Marzo et al, 1998a). **Bax** interacciona con **ANT** y permeabiliza membranas lipídicas en respuesta a **atractilato** (**Atr**) (Marzo et al, 1998a). **Bcl-2** también interacciona con **ANT** y podría actuar estimulando la función transportadora de ADP/ATP que **ANT** tiene de forma natural, mientras que **Bax**, después de un cambio conformacional de **ANT** inducido por **Atr**, estaría estimulando su función formadora de poros. De forma inversa, **Bax** podría disminuir su función translocadora, y **ATP**, **ADP** y **Bcl-2**, podrían inhibir la función formadora de poros (Belzacq et al, 2002).

6.4.2. Interacciones con VDAC

Bax y **Bcl-2** o **Bcl-X_L** podrían además interaccionar con **VDAC** para abrirlo o cerrarlo, respectivamente, sugiriendo que estos efectores apoptóticos también modulan el **PTP** a través de asociaciones con **VDAC** (Shimizu et al, 1998) (Shimizu et al, 1999) (Shimizu et al, 2000).

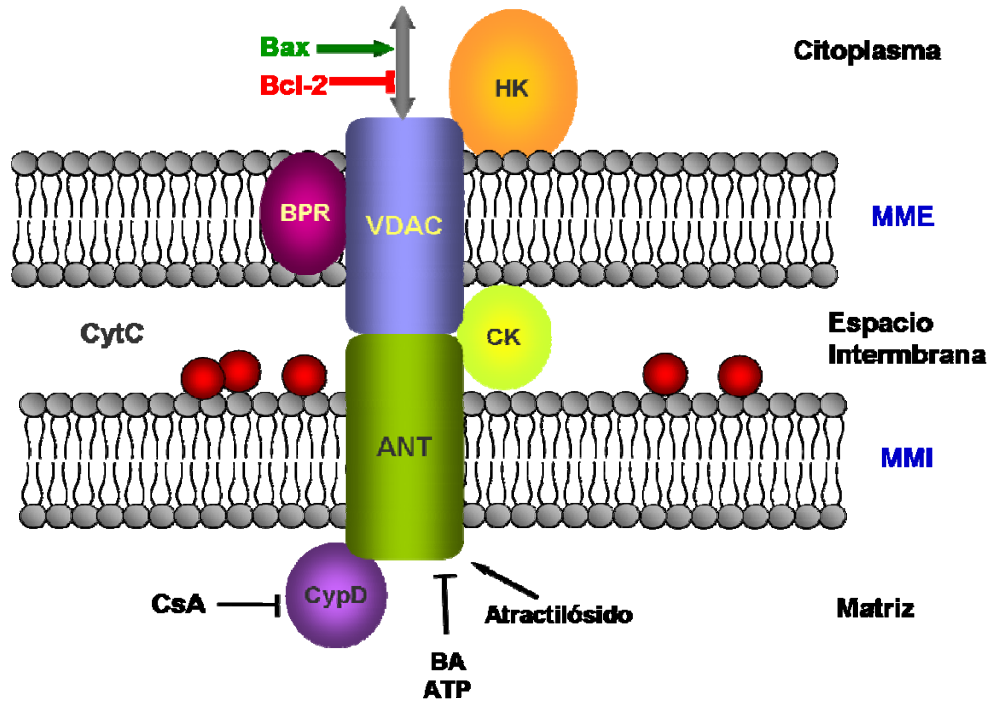


Figura 5. Modelo de PTP.

II. FORMAS ATÍPICAS DE MUERTE CELULAR

Además de la apoptosis o muerte celular tipo I, existen otras categorías de muerte celular, que se describen a continuación.

1. Necrosis

La necrosis es el nombre que se da a la muerte celular accidental, y es un proceso que comienza con una dilatación de la célula, la digestión de la cromatina y la disrupción de la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos. Las fases finales de la necrosis se caracterizan por una extensa hidrólisis del ADN, vacuolización del retículo endoplasmático, rotura de los orgánulos y lisis celular. Durante la necrosis, el contenido celular se libera de modo incontrolado al exterior celular conteniendo productos dañinos para las células cercanas y provocando una fuerte respuesta inflamatoria en el correspondiente tejido (Leist & Jaattela, 2001) (Savill & Fadok, 2000).

A diferencia de la apoptosis, el reciclaje de los restos celulares por los fagocitos y el sistema inmune se ve dificultado en los procesos necróticos porque la célula muerta no envía señales a los fagocitos cercanos para ser eliminada. La pérdida de esta señalización, complica la localización y reciclaje de las células muertas por el sistema inmune.

2. Otros tipos de muerte celular programada (PCD)

Aunque la apoptosis es el paradigma de la muerte celular programada, existen otras formas de muerte celular que también están genéticamente reguladas (Broker et

al, 2005). Estas formas diferentes de muerte celular tienen en común que son ejecutadas por procesos celulares activos que pueden ser inhibidos interfiriendo en sus rutas de señalización, lo que los diferencia de la necrosis accidental (Leist & Jaattela, 2001). A diferencia de la apoptosis, estas rutas de **PCD** son generalmente independientes de la activación de caspasas. Una de las primeras demostraciones claras de la existencia de **PCD** caspasa-independiente, llegó de la mano de Xiang et al., quien mostró que la inhibición de la actividad de las caspasas en una línea celular de leucemia humana, las células Jurkat, no inhibía la muerte inducida por **Bax**, sino que únicamente cambiaba la morfología asociada al proceso de muerte (Xiang et al, 1996). Además, se han descrito otras proteasas, diferentes de las caspasas, como **catepsinas** y **calpaínas**, que son capaces de ejecutar procesos de **PCD**. En estas rutas de muerte alternativas, la mitocondria puede jugar un papel clave, como en la apoptosis, pero también participan otros orgánulos, como los lisosomas o el retículo endoplasmático, que desempeñan una importante función en la activación de estas proteasas alternativas. Entre estos tipos de **PCD**, se incluyen la **autofagia**, **paraptosis** o **catástrofe mitótica**, aunque se pueden activar más de uno de estos programas simultáneamente (Broker et al, 2005).

Estas otras formas de muerte celular, aparte de basarse en mecanismos moleculares diferentes a la apoptosis, van acompañados de cambios en la morfología celular que son marcadamente diferentes del *blebbing* y reducción del tamaño celular que caracterizan a la apoptosis (Broker et al, 2005). Por ejemplo, la **autofagia** o muerte celular del tipo II provoca un desprendimiento de las células de su sustrato mientras adoptan una apariencia globular (Shimizu et al, 2004). Por otro lado, la **paraptosis** o muerte celular de tipo III, implica una extensa vacuolización citoplasmática (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002) (Broker et al, 2005).

2.1. Proteasas no caspasas

2.1.1. Catepsinas

Son una familia de cisteín proteasas que se localizan en muchos tipos celulares diferentes y desempeñan un papel vital en la regeneración celular a través de

procesos autofágicos. Existe aproximadamente una docena de miembros de esta familia, que se distinguen por su estructura y los sustratos que procesan. Muchas de las catepsinas se activan a los bajos niveles de pH encontrados en los lisosomas y, por tanto, la actividad de estas proteasas se realiza casi enteramente en estos orgánulos. Estas catepsinas lisosomales adquieren un papel relevante en las rutas de muerte celular cuando la actividad de las caspasas está suprimida (Leist & Jaattela, 2001) (Bursch, 2001). Por ejemplo, se ha visto que la catepsina B, forma parte de la señalización de muerte celular por TNF- α (Guicciardi et al, 2000), actuando como una molécula ejecutora e induciendo **PCD** en células cuya actividad caspasa está comprometida (Foghsgaard et al, 2001), o en necrosis (Hentze et al, 2003).

2.1.2. Calpaínas

Son una familia de cisteín proteasas calcio-dependientes que se expresan de modo ubicuo en mamíferos y en muchos otros organismos (Croall & Ersfeld, 2007). Se han secuenciado más de una docena de isoformas, algunas de ellas con múltiples variantes de *splicing*. Estas proteasas han sido relacionadas con muerte celular por apoptosis, pero también parecen ser un componente esencial de la necrosis (Golstein & Kroemer, 2007). Las calpaínas presentan su actividad óptima a pH neutro, lo que explica que no actúen en los lisosomas, diferenciándose así claramente de las catepsinas. Debido a su dependencia del calcio, su localización intracelular y su especificidad de sustrato, se ha propuesto que, más que ser una proteasa digestiva, las calpaínas poseen un papel regulador (Ersfeld et al, 2005) (Pils & Schultz, 2004).

2.2. Muerte celular autofágica (lisosomal o de tipo II)

La autofagia (Clarke, 1990) (Schweichel & Merker, 1973), es un fenómeno fisiológico esencial para el normal funcionamiento de la célula (Mizushima et al, 2004)

(Yoshimori, 2004), que ayuda a eliminar componentes celulares anormales que se acumulan durante procesos de estrés celular (Dunn, 1990) (Mortimore et al, 1989). La autofagia se ha asociado a varios procesos fisiológicos importantes, como la renovación de las proteínas y orgánulos en respuesta al ayuno (Mizushima et al, 2004) (Mortimore & Poso, 1987) (Tsukada & Ohsumi, 1993), la remodelación tisular durante los procesos de diferenciación de distintos organismos (Tsukada & Ohsumi, 1993) (Juhász et al, 2003) (Otto et al, 2003) (Melendez et al, 2003), muerte celular (Clarke, 1990), o varias alteraciones patológicas como en enfermedades neurodegenerativas (Petersen et al, 2001) (Ravikumar et al, 2002) o cáncer (Qu et al, 2003). El proceso autofágico consiste en el secuestro de fracciones del citoplasma y orgánulos celulares dentro de vesículas autofágicas denominadas autofagosomas, que se caracterizan por poseer una doble membrana (Wang & Klionsky, 2003) (Xie & Klionsky, 2007). Posteriormente estas vesículas se fusionan con los lisosomas donde su contenido citoplasmático es liberado y degradado por las enzimas lisosomales (Klionsky & Emr, 2000) (Noda et al, 2002) (Reggiori & Klionsky, 2002).

La autofagia podría ser considerada como un mecanismo protector en situaciones de estrés, un intento de reducir la demanda metabólica de la célula consumiendo en primer lugar las proteínas menos necesarias. Sin embargo, cuando la autofagia alcanza sus límites, entonces se podría producir la muerte celular (Lockshin & Zakeri, 2004). De este modo, si se produce un fenómeno de estrés en la célula, se activa la autofagia como mecanismo para recuperar el funcionamiento normal. Sin embargo, si la célula está demasiado dañada y la autofagia no es capaz de reestablecer las condiciones fisiológicas, el exceso de autofagia acabaría por eliminar la célula sin activación de caspasas (Gozuacik & Kimchi, 2004). Por ejemplo, en respuesta a estrés oxidativo, las células pueden protegerse a sí mismas utilizando la autofagia para eliminar los orgánulos dañados, especialmente las mitocondrias que son una de las principales dianas del estrés oxidativo (Nieminen et al, 1997). Sin embargo, si el daño es excesivo la autofagia podría acabar por eliminar la célula (Lockshin & Zakeri, 2004) (Levine, 2007).

En la inducción del fenómeno autofágico, además de moduladores relevantes conocidos como las proteínas APG5 y Beclin, se ha visto que también participan como reguladoras proteínas de la familia **Bcl-2** (Shimizu et al, 2004), indicando un interesante nexo entre autofagia y apoptosis.

2.2.1. Detección de muerte celular autofágica

El fenómeno autofágico fue inicialmente descubierto por microscopía electrónica a principios de la década de los 60 (Ashford & Porter, 1962), y la detección mediante esta técnica de las características vacuolas de doble membrana, se ha convertido en el método más estandarizado para detectar autofagia. Otro método muy empleado es la detección mediante microscopía de fluorescencia de la proteína **LC3** (proteína asociada a microtúbulos *light-chain 3*). Durante el proceso autofágico, **LC3** se concentra en la membrana del autofagosoma y, por tanto, el patrón difuso de fluorescencia que se obtiene por la expresión en la células de **GFP-LC3**, se convierte en un patrón punteado debido a la translocación de la proteína a la vacuola (Kabeya et al, 2000) Asimismo, durante la translocación de LC3 a la vacuola autofágica, la proteína sufre una adición lipídica que se traduce en una reducción aparente de su peso molecular detectable mediante *western blot* (Mizushima, 2004). Además, la autofagia se puede detectar morfológicamente porque los procesos autofágicos se han asociado a la aparición de células redondeadas que adquieren un aspecto globular (Shimizu et al, 2004).

2.3. Paraptosis o muerte celular tipo III

La paraptosis se caracteriza por la inducción de una intensa vacuolización citoplasmática que comienza con la progresiva dilatación de la mitocondria y del retículo endoplasmático (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002) (Broker et al, 2005). Típicamente, esta forma de muerte celular no implica la activación de caspasas, por lo que no responde a sus inhibidores. Tampoco se produce la formación de los cuerpos apoptóticos ni otras características propias de la morfología apoptótica (Sperandio et al, 2000). Aunque aún es un proceso de muerte celular poco estudiado, se ha descrito que la paraptosis está mediada por **MAPK** (proteín quinasa activada por mitógenos) (Sperandio et al, 2004) y puede ser inducida por el miembro de la

familia de receptores TNF, **TAJ/TROY** (Wang et al, 2004), y el **IGFR-1** (receptor del factor de crecimiento de la insulina tipo I) (Sperandio et al, 2004).

2.4. Catástrofe mitótica

Otro tipo de muerte celular programada es la denominada catástrofe mitótica. Este proceso está causado por un fallo mitótico provocado por un defecto en los puntos de control del ciclo celular que conlleva el desarrollo de un gran número de células aneuploides que son inviables (King & Cidlowski, 1995). La catástrofe mitótica puede ser inducida por agentes estabilizadores o desestabilizadores de los microtúbulos o por daño en el ADN (Roninson et al, 2001). Se ha visto que esta forma de muerte celular va acompañada de permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas (Castedo et al, 2004), pero se ha argumentado que es fundamentalmente diferente a la apoptosis, ya que la inhibición de las caspasas o la sobreexpresión de **Bcl-2** no previenen la muerte de la célula (Roninson et al, 2001) (Lock & Stribinskiene, 1996).

En conclusión, no sólo las caspasas, sino también las calpaínas, catepsinas y otras proteasas, pueden ejecutar programas de muerte celular programada. Estas rutas alternativas a la mitocondria se pueden solapar entre sí y están dirigidas por varios orgánulos celulares como los lisosomas o el retículo endoplasmático. El conocimiento de otros procesos de muerte celular independientes de caspasas puede proporcionar avances importantes en el campo de la oncología, ya que podrían potencialmente ser manipulados para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

III. SCREENINGS FUNCIONALES

Recientemente ha sido secuenciado el genoma completo de un gran número de organismos, incluido el humano (Lander et al, 2001) (Venter et al, 2001). Sin embargo, el conocimiento de la secuencia de estos genomas constituye sólo el primer paso para conocer la función de cada uno de los genes que los componen. En consecuencia, uno de los retos de la nueva era post genómica consiste en la anotación funcional de la totalidad de los genes codificados en el genoma y, para poder abordar este objetivo, se hace necesario el desarrollo de nuevas plataformas experimentales de alta capacidad que permitan el manejo y análisis simultáneo de un gran número de moléculas. La reciente llegada de **sistemas robóticos** de alto rendimiento ha facilitado esta masificación, y estos sistemas se han convertido en potentes herramientas para explorar la función génica en el contexto de los diferentes genomas.

Dada la enorme complejidad del genoma de organismos superiores, se ha realizado un esfuerzo importante para diseñar metodologías experimentales que, en combinación con técnicas robóticas, permitan una mayor capacidad analítica (Grimm, 2004) (Kiss-Toth et al, 2004). Una de ellas es el **clonaje por expresión**, donde colecciones de ADNc se expresan en células en cultivo y se testa su capacidad para regular las cascadas de señalización que resulten de interés (Grimm, 2004) (Kiss-Toth et al, 2004) (Ting et al, 2005). Muchos de estos métodos se basan en una propiedad que frecuentemente comparten los mediadores de transducción de señales: su capacidad para inducir la cascada de señalización en la que están implicados, simplemente al ser sobreexpresados en células susceptibles. Este principio general ha sido utilizado en el diseño de, por ejemplo, *screenings* para identificar genes humanos que activan las rutas de señalización de **NF-κB** (factor nuclear κB) (Matsuda et al, 2003). Un argumento comparable ha sido empleado para

diseñar un sistema de clonaje para la identificación de activadores de la ruta de **MAPK** (Chanda et al, 2003) (Matsuda et al, 2003) o de reguladores de la proteólisis de la proteína amiloide (Schobel et al, 2006).

Del mismo modo, muchos mediadores de apoptosis inducen muerte celular cuando se sobreexpresan en células susceptibles y, gracias a este principio, se han podido establecer sistemas de *screening* para la identificación de genes inductores de apoptosis (Gewies & Grimm, 2003) (Schoenfeld et al, 2004). Por ejemplo, ya en el 2003, Albayrak y Grimm desarrollaron un sistema de *screening* partiendo de una genoteca de ADNc clonada en un vector de expresión, transfectando por separado cada uno de los clones en células HEK-293T (Albayrak & Grimm, 2003).

De forma similar, publicaciones previas sugieren que la sobreexpresión de las moléculas implicadas en procesos de **PCD** no apoptóticos, también activan la maquinaria de ejecución de muerte celular. Por ejemplo: la proteína **DAPK** (*death-associated protein kinase*), que desempeña un papel en la inducción de autofagia, activa esta ruta de muerte celular cuando se sobreexpresa (Inbal et al, 2002). Otro ejemplo es la proteína **NIP** (*BCL2/adenovirus 19kDa-interacting protein*), que media la autofagia inducida por trióxido de arsénico y también activa este tipo de muerte celular al ser transfectada (Kanzawa et al, 2005). De modo similar, la muerte paraptótica se induce por la expresión del **IGFR-1** (Sperandio et al, 2000).

Dadas estas premisas al inicio de este trabajo de tesis doctoral, se planteó la posibilidad de identificar mediadores de señalización implicados en diferentes programas de muerte celular, analizando genotecas de expresión de ADNc y aislando aquellos clones cuya expresión fuera capaz de inducir las distintas modalidades de muerte celular detectadas por sus características morfológicas. Puesto que, como ya se ha comentado, una propiedad común de la mayoría de células cancerígenas es su resistencia adquirida a sufrir muerte celular, la identificación de genes capaces de inducir apoptosis u otros procesos de muerte celular en células tumorales, abre la posibilidad de encontrar rutas de muerte que permanecen activas en células transformadas, y que pudieran ser útiles en el desarrollo de futuras terapias en el tratamiento contra el cáncer.

Objetivos

- 1. Identificación funcional de moléculas cuya sobreexpresión induce procesos morfológicamente definidos de muerte celular.**
- 2. Estudio y caracterización de las moléculas clonadas, y de la ruta a través de la cual activan el programa de muerte celular.**

Resultados

I. SCREENING FUNCIONAL

El objetivo principal de este estudio consistió en la identificación funcional de genes implicados en procesos de muerte celular programada, con objeto de mejorar así la comprensión de dichas vías y su compleja red señalizadora.

El análisis se fundamentó en la ya comentada propiedad, que comparten la mayoría de las moléculas implicadas en distintas modalidades de **PCD**, de activar la maquinaria de ejecución de muerte celular al ser sobreexpresadas en células susceptibles.

1. Detección morfológica

Como ya se ha mencionado, los procesos de muerte celular programada, tanto apoptóticos como no apoptóticos, pueden ser fácilmente identificados sobre la base de los cambios morfológicos que sufren las células durante el proceso de muerte. Así, por ejemplo, las células apoptóticas se pueden identificar morfológicamente porque se muestran encogidas y con rugosidades en su membrana plasmática (*blebbing*). También se pueden detectar morfológicamente los procesos de muerte celular autofágica, puesto que se caracterizan por la aparición de células redondeadas e irregulares que adquieren un aspecto globular (Shimizu et al, 2004). Otro proceso de **PCD** identificable por las alteraciones morfológicas que provoca es la paraptosis, caracterizada por la aparición de células que presentan una intensa vacuolización citoplasmática (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002) (Broker et al, 2005). Estos cambios morfológicos son particularmente fáciles de detectar si las células que los sufren expresan la proteína verde fluorescente (GFP) (**Figura 1**).

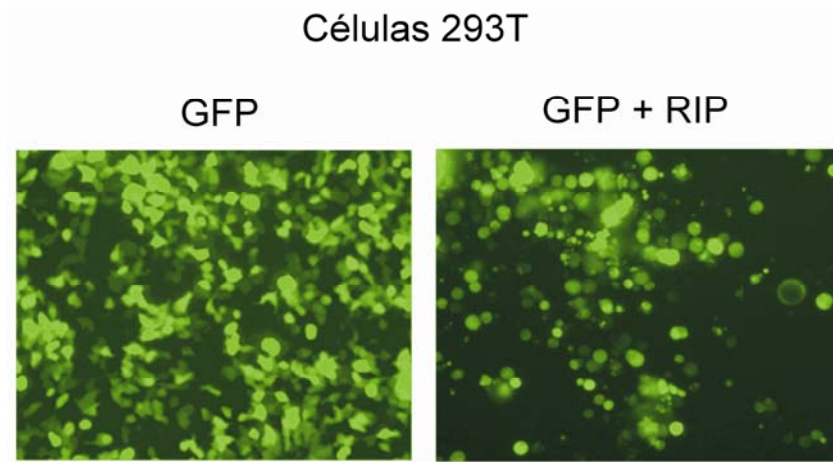


Figura 1. Ejemplo de detección morfológica de células apoptóticas. Células HEK-293T cotransfectadas con GFP y vector vacío (izquierda) o RIP (derecha).

En este estudio se ha abordado un cribado funcional de una genoteca de ADNc clonada en un vector de expresión para identificar clones cuya sobreexpresión resulta en la aparición de alguno de estos cambios en la estructura celular característicos de diferentes modos de muerte programada. Las alteraciones morfológicas inducidas por la sobreexpresión de los clones relevantes se detectaron en presencia de GFP, puesto que la presencia de esta proteína fluorescente realza dichas alteraciones.

2. Sistema de identificación funcional

Para abordar este trabajo, se partió de una genoteca de ADNc obtenida a partir de linfocitos T humanos “activados” y clonada en el vector de expresión pEAK (Edge Biosystems). Con el fin de aumentar la capacidad del método de análisis, en lugar de transfectar clon a clon, éstos se organizaron en grupos. Para ello se emplearon sistemas robóticos que permitieron procesar una extensa colección de clones.

2.1. Optimización del tamaño de los grupos

En primer lugar, se estableció el tamaño óptimo de los grupos de clones. Para ello, se realizaron diluciones crecientes de plásmidos que contenían moléculas proapoptóticas conocidas, y se transfectaron en células HEK-293T con objeto de determinar la dilución máxima que aún permitía la detección morfológica de la apoptosis inducida por las moléculas escogidas. Para inducir apoptosis, se emplearon las moléculas proapoptóticas **RIP** y **FADD**. Ambas proteínas, inducen apoptosis en células de mamífero interactuando con los receptores de la superfamilia TNF (Baker & Reddy, 1996).

FADD (*FAS-associated death domain protein*) es una molécula adaptadora que se une a Fas (CD95 o APO-1) y a TNFR1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral) a través de su dominio de muerte (*Death Domain*, DD). Esta interacción, provoca el reclutamiento y activación de la caspasa-8 (o también la caspasa-10), que a su vez activa a caspasas efectoras, como la -3, -6 y -7, desencadenando la cascada de acontecimientos que finalmente conducen a la apoptosis (Chinnaiyan et al, 1995) (Boldin et al, 1995).

RIP (*receptor interacting protein*) es una Serin/Treonin quinasa que también se asocia a Fas y TNFR1 a través de su dominio de muerte, y promueve apoptosis y la activación de NF-kappa-B (Stanger et al, 1995) (Hsu et al, 1996).

Los plásmidos que expresaban RIP y FADD, fueron progresivamente diluidos en plásmido vacío y transfectados en células **HEK-293T**, mediante el método de precipitación con fosfato cálcico, junto con un vector que expresaba **GFP** (*Green Fluorescent Protein*). La presencia de GFP permitió la identificación de las características morfológicas asociadas a los fenómenos de muerte celular. La aparición de signos apoptóticos, fue detectable, por microscopía de fluorescencia convencional, hasta diluciones de 1/100, gracias a la presencia de GFP en las células transfectadas.

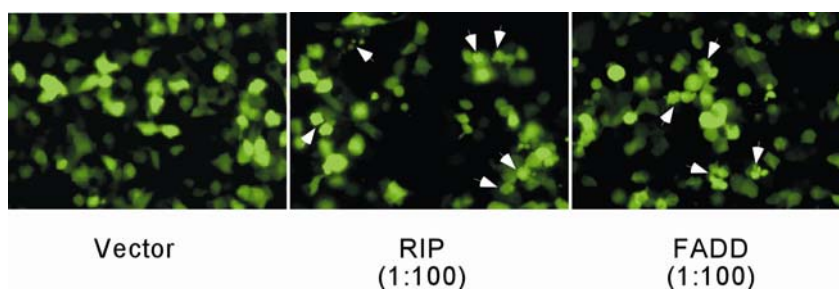


Figura 2. Detección de la morfología apoptótica inducida por moléculas proapoptóticas diluidas. Células HEK-293T cotransfectadas con GFP y las moléculas indicadas.

Sobre la base de estos resultados, se eligió un tamaño de grupo de 96 clones por grupo (**Figura 2**).

2.2. Sistema de clonaje por expresión

La genoteca de ADNc fue sembrada en placas de 22 x 22 cm y las colonias bacterianas obtenidas se inocularon en placas de 384 pocillos utilizando un sistema robótico capaz de picar las colonias con alta eficacia (QpixII, Genetix). Posteriormente, cada uno de los 96 clones que se generan al dividir las placas de 384 pocillos en 4 sectores, se agruparon en un nuevo pocillo de un bloque de 96 pocillos con 1,5 ml de medio de cultivo (**grupo 1^{ario}**), usando el mismo sistema robótico. En este proceso se obtuvo un volumen suficiente de cultivo para poder extraer el ADN plasmídico utilizando el Biorobot-3000 de Qiagen. Las placas de 384 pocillos originales se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta el momento de su utilización.

El ADN obtenido de cada grupo 1^{ario}, se cotransfectó en células **HEK-293T** por el método de precipitación con fosfato cálcico, junto con un plásmido que expresaba **GFP**. 24 y 36h después, las células transfectadas se analizaron *in vivo* utilizando un microscopio de fluorescencia invertido, tratando de identificar pocillos que

presentaran células transfectadas con cambios morfológicos compatibles con muerte celular (**Figura 3**).

Para identificar el clon responsable de esos cambios morfológicos y aislarlo dentro del grupo 1^{ario} detectado como positivo, se descongeló de nuevo la placa original de 384 pocillos a partir de la cual se había obtenido ese grupo, y se reagrupó el cuadrante al que correspondía por filas y por columnas (**grupos 2^{arios}**). De estos grupos 2^{arios} se obtuvo de nuevo ADN plasmídico que fue cotransfectado con **GFP** para identificar aquellos que retenían la capacidad de provocar los cambios morfológicos detectados originalmente. De este modo, el clon causante del fenotipo observado estaba representado simultáneamente en dos **grupos 2^{arios}**, aquellos formados por todos los clones de la fila y de la columna en la que se encontraba localizado. La intersección entre dos **grupos 2^{arios}** positivos proporcionó la posición exacta del clon en cuestión. En el caso de encontrar más de una fila o columna positivas, se estudiaron todas las intersecciones posibles, puesto que podía haber más de un clon positivo en el sector original (**Figura 3**).

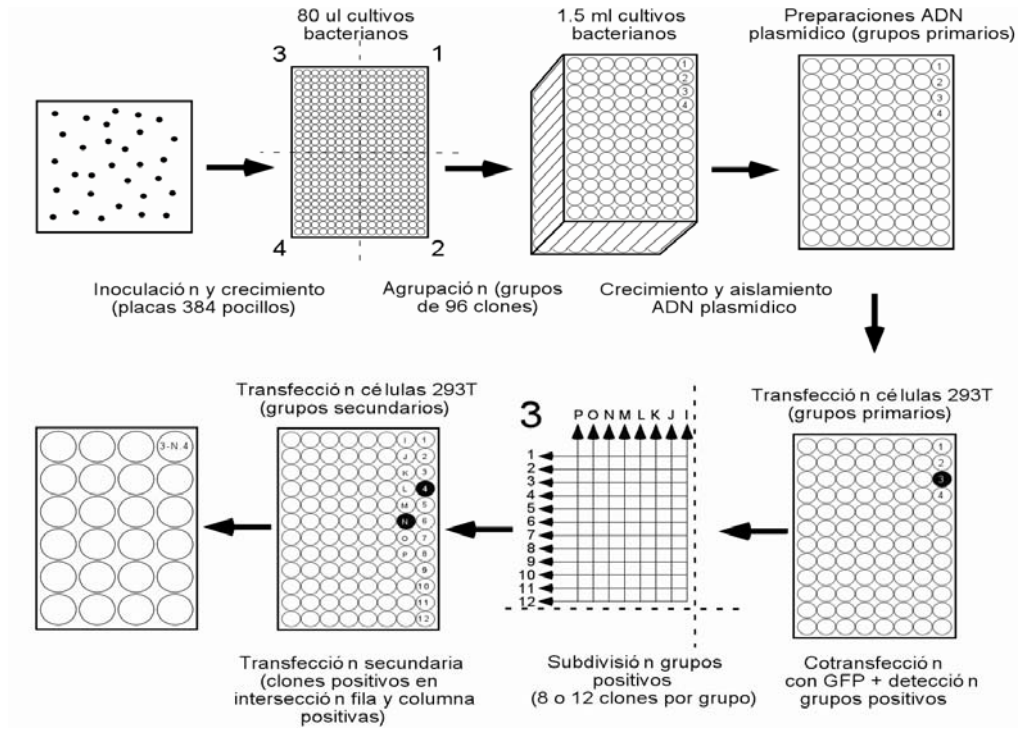


Figura 3. Esquema del clonaje por expresión. Los clones de la librería de ADNc fueron sembrados en placas de 384 pocillos. Grupos de 96 clones fueron subsecuentemente generados a partir de cada uno de los cuatro sectores indicados de la placa. El ADN plasmídico obtenido de los grupos se cotransfectó con un plásmido que expresaba GFP en células 293T, y se detectó muerte 36 h después. El aislamiento de los clones positivos se llevó a cabo subagrupando todas las filas y columnas del cuadrante original a partir del cual se obtuvo el grupo positivo, y cotransfectando el ADN plasmídico obtenido de estos subgrupos con GFP. Los clones positivos se localizaban en la intersección entre las filas y columnas positivas.

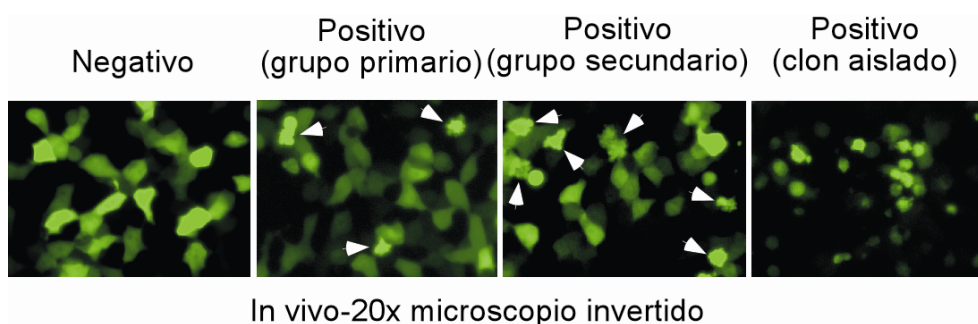


Figura 4. Secuencia cronológica de identificación de uno de los clones positivos.

Este esquema se aplicó a **135000 clones** de la genoteca y se llegaron a aislar hasta **229 ADNcs** capaces de provocar, en las células transfectadas, alteraciones morfológicas compatibles con diversos procesos de muerte celular.

2.3. Confirmación de la muerte celular: marcaje con IP

En primer lugar se comprobó que los cambios morfológicos observados tras la transfección con los clones positivos realmente desembocaban en la muerte de la célula, y no eran simplemente unas alteraciones transitorias que no afectaban a la viabilidad celular. Para ello, se utilizó una técnica muy común para identificar muerte celular que consiste en una tinción celular con yoduro de propidio (**IP**). El **IP** es una molécula fluorescente que se intercala en el ADN y también en el ARN. La membrana celular es normalmente impermeable a este marcador, pero las células muertas presentan sus membranas dañadas y son incapaces de excluirlo. El IP que ha entrado en las células se puede detectar mediante microscopía de fluorescencia por la emisión de una señal roja (**Figura 5**, panel inferior).

Resultados

181 clones, de los **229 totales**, dieron un marcaje positivo para **IP** (no se muestra), indicando que las 48 moléculas restantes inducían cambios morfológicos que no resultaban en muerte celular. Muchos de estos clones fueron considerados inicialmente como “inductores débiles” de los cambios morfológicos asociados a distintos **PCD**, y fueron generalmente identificados en grupos primarios que también contenían un “inductor fuerte”. La subdivisión por filas y columnas de estos grupos ¹arios puso de manifiesto el potencial inductor débil de estos clones.

3. Secuenciación y clasificación

Los **181 clones** identificados fueron secuenciados y la información obtenida se comparó con el banco de datos del **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**, utilizando el algoritmo Blast. La identificación de todos los clones permitió reducir la colección a **92 miembros** no redundantes que se clasificaron en la siguiente tabla:

3.1. Tabla 1. Lista de moléculas clonadas.

Familia	Molécula ^a	Modo de muerte ^b	Cantidad de muerte ^c
Transportadores mitocondriales	ANT3 (FL; NM_001636)	Apoptótico	+++
	Transportador de fosfato (FL; NM_002635)	Apoptótico	+++
	MTCH1b (TR; NM_014341)	Apoptótico	+++
	MTCH2 (FL; NM_014342)	Vac.(I)/Apoptótico	+
Mitocondria	TIMM17 (FL; NM_006335)	Apoptótico	+
	TOMM20 (FL; NM_014765)	Apoptótico	++
	VDAC1 (FL; NM_003374)	Apoptótico	+

	Mitoch. translation optim. homolog (TR; NM_012123)	Apoptótico	++
Señalización celular	RAS-related proto-oncogene, RALB (FL; NM_002881)	Vacuolado (R)	++
	GNAS-transcripto 1 (TR; NM_000516)	Apoptótico	++
	RAC2 (FL; NM_002872)	Globular	+
	TRAF3-interacting protein (TR; NM_025228)	Apoptótico	+
	RHOA (FL; NM_001664)	Apoptótico	+
	SAM SH3 dominios, SAMSN1 (TR; NM_022136)	Apoptótico	++
	Proto-oncogen de sarcoma felino, FES (TR; NM_002005)	Apoptótico	+++
	Ras-like without CAAX-1, RIT1 (FL; NM_006912)	Vacuolado (R)	++
	Megakaryocyte assoc. kinase, MATK (TR; NM_139354)	Apoptótico	++
	FMR1-interacting protein 2,CYFIP2 (TR; NM_014376)	Apoptótico	++
RHOH (FL; NM_004310)	Apoptótico	+	
Apoptosis	RIPK3 (FL; NM_006871)	Apoptótico	+++
	BNIP3L (FL; NM_004331)	Apoptótico	+++
	BAX (FL; NM_138761)	Apoptótico	+++
	Caspasa-4 (FL; NM_001225)	Apoptótico	++
	Caspasa-1 (FL; NM_033292)	Apoptótico	++
	CD95 (FL; NM_152872)	Apoptótico	+++
	Granzima B (FL; NM_004131)	Apoptótico	+++

Resultados

Proteínas de membrana	MHC-I (TR; NM_002116)	Apoptótico	++
	Receptor cisteinil leucotrieno tipo 1 (FL; NM_006639)	Vacuolado (I)	+
	CD48 (TR; NM_001778)	Apoptótico	+
	CD7 (TR; NM_006137)	Apoptótico	+
	CD74 (TR; NM_004355)	Vacuolado (I)	+
Metabolismo	GAPDH (TR; NM_002046)	Apoptótico	+
	Holocitocromo c sintasa (FL; NM_005333)	Apoptótico	+
	ATP-sintasa F1 (TR; NM_001686)	Apoptótico	+
	Glucosa fosfato isomerasa (TR; NM_000175)	Globular	+
	Quinolinato fosforibosil-transferasa (FL; NM_014298)	Apoptótico	+
	ATP-sintasa F0 (FL; NM_006476)	Apoptótico	+
	Citocromo C oxidasa-subunidad IV (FL; NM_001861)	Apoptótico	++
	Succinato deshidrogenasa C (TR; NM_003001)	Apoptótico	++
	Cytochrome c assembly 1-like, OXA1L (TR; NM_005015)	Apoptótico	+
	Elongation very long fatty acids-like (TR; NM_022821)	Globular	+
	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (TR; NM_000182)	Globular	+
	Fosfofructo kinasa (TR; NM_002627)	Globular	+

Diferentes familias	Exportina 1 (TR; NM_003400)	Apoptótico	+
	Nucleoporina-205 (TR; NM_015135)	Apoptótico	+++
	Miembro 7 de la familia CHMP (TR; NM_152272)	Apoptótico	++
	Proteína de asociación microfibrilar 1, MFAP1 (TR; NM_005926)	Apoptótico	++
	Pharynx defective 1 homolog, APH1b (FL; NM_031301)	Vacuolado (I)	++
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R (FL; NM_017811)	Vacuolado (I)	+
	Proteína ribosomal larga P0 (TR; NM_001002)	Apoptótico	+
	Insuficiencia adrenocortical (FL; NM_015665)	Apoptótico	+++
	Factor traducción elongación 1 (TR; NM_001402)	Apoptótico	+
	Metionil aminopeptidasa 1 (TR; NM_015143)	Apoptótico	+
	MARK2 (TR; NM_017490)	Vacuolado (R)	+
	Na/K transporting ATPase (TR; NM_001001586)	Apoptótico	++
	Factor de iniciación de traducción 3 (TR; NM_003754)	Globular	+
	ADP-ribosilation-like factor int prot. 5 (TR; NM_006407)	Globular	+
	High mobility gr.-Nucleosome binding (TR; NM_004965)	Globular	+

Resultados

Resistencia mixovirus 1 (TR; NM_002462)	Apoptótico	+
c-EBP-zeta (TR; NM_005760)	Apoptótico	++
Reticulon 3 (TR; NM_006054)	Vacuolado (I)	+
Proteína de interacción con fosfatasa PSTPIP1 (FL; NM_003978)	Vacuolado (R)	+
Transaldolasa 1 (TR; NM_006755)	Apoptótico	+
Aurora Kinasa A6 (TR; NM_198437)	Globular	+
Citohesina 2 (FL; NM_004228)	Vacuolado (I)	+
Proteína ribosomal L10a (TR; NM_007104)	Globular	++
Branched Caín aminotransferase 2 (TR; NM_001190)	Vacuolado (I)	+
Simplekina (TR; NM_004819)	Apoptótico	++
Receptor de cadenas alfa de células T (FL; AY247836)	Apoptótico	++
FUS (TR; NM_004960)	Apoptótico	+
Proteína de choque térmico 70, HSPA8 (TR; NM_006597)	Apoptótico	+
Chaperonin containing TCP1 (TR; NM_012073)	Apoptótico	+
MutS homologo 2, MSH2 (TR; NM_000251)	Apoptótico	+

	Prot. de membrana secretora de transportadores 3 (TR; NM_005698)	Globular	+
	Anexina A7 (TR; NM_004034)	Apoptótico	+
	Sintaxina 4 (TR; NM_004604)	Globular	+
	IL32 (FL; NM_004221)	Globular	+
	UBX domain containing 2 (TR; NM_014607)	Apoptótico	++
	Beta-actina (TR; NM_001101)	Apoptótico	+
	Gamma-actina (TR; NM_001614)	Apoptótico	++
Desconocido	FAM104A (FL; NM_032837)	Vacuolado (I)	+
	Zn-finger containing MYM6 (FL; BC029439)	Globular	++
	Deshidrogenasa putativa, CGI49 (TR; NM_016002)	Apoptótico	+++
	Proteína hipotética (TR; XM_941317)	Apoptótico	+++
	DENN/MADD-containing 1A (TR; NM_020946)	Apoptótico	+
	C2orf33 desconocida (FL; NM_020194)	Apoptótico	++
	TBC1 domain family member 10C (TR; NM_198517)	Apoptótico	++
	DDHD domain containing 2 (TR; NM_015214)	Apoptótico	++

Resultados

	Proteína transmembrana 106C (TR; NM_024056)	Apoptótico	+
	Desconocida (TR; NM_014855)	Apoptótico	++
	Desconocida (TR; NM_025176)	Apoptótico	+
	Hipotética (TR; XM_930748)	Apoptótico	++

^a Incluye el nombre de la molécula así como la integridad del clon (FL, *full length*; TR, tuncado) con respecto a la secuencia indicada (RefSeq).

^b R e I vacuolas regulares o irregulares, respectivamente.

^c Gradación de la inducción de muerte celular 36h después de la transfección. (+), por debajo del 10% de las células transfectadas son iodo de propidio (IP)-positivas; (+ +), entre el 10 y el 30% de las células transfectadas son IP-positivas; (+ + +); más del 30% de las células transfectadas son IP-positivas.

Dentro de la colección de moléculas clonadas se identificaron proteínas pertenecientes a diversas familias estructurales y funcionales. Por ejemplo, un gran número de clones codifican moléculas implicadas en procesos metabólicos como la glucosa fosfato isomerasa o la ATP-sintasa F_0 (**Tabla 1**), sugiriendo la existencia de una estrecha relación entre pequeñas alteraciones en el metabolismo y la inducción de muerte celular. También se clonaron recurrentemente moléculas implicadas en la formación del citoesqueleto, como diversas formas de γ -actina y β -actina, o **PIR121** (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*), una proteína inducible por p53 que inhibe la actividad de la proteína WAVE1 (Eden et al, 2002). WAVE1 es un miembro de la familia SCAR/WAVE (Miki et al, 1998) que regula el ensamblaje de actina por su unión y activación al complejo Arp2/3 (Machesky et al, 1999). Otra de las moléculas relacionadas con el citoesqueleto es la **simplekina**, una proteína nuclear que participa en el ensamblaje de la maquinaria de poliadenilación (Takagaki & Manley, 2000), y que también se localiza en las *tight junctions* o uniones estrechas (Keon et al, 1996) que conectan el citoesqueleto de células adyacentes. De forma interesante, todas estas moléculas fueron clonadas como formas truncadas. Una posible explicación de este fenómeno sería que, al tratarse de formas incompletas, estuvieran

interfiriendo con las formas endógenas, éstas serían esenciales para la viabilidad celular y por tanto desencadenarían un proceso de muerte.

3.2. Mediadores apoptóticos clonados

Muchos de los ADNcs clonados correspondían a moléculas conocidas por su implicación en vías apoptóticas, validando así la capacidad del sistema para identificar reguladores significativos del proceso apoptótico. A continuación, se describen brevemente estas proteínas:

RIP3 (o **RIPK3**, *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*). Pertenece a la familia de serín-treonín quinasas RIP (*receptor interacting protein*), que forman parte del complejo de señalización del TNFR-1. Cuando se expresa en células de mamífero, puede inducir apoptosis y el factor de transcripción NFκB (Yu et al, 1999).

BNIP3L (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3-like*). Este gen pertenece a la familia de las proteínas proapoptóticas BNIP. Esta molécula interacciona con la proteína adenoviral E1B 19kDa, responsable de la protección frente a la muerte celular inducida por virus, así como con el homólogo Bcl-2. Puede desempeñar un papel como supresor de tumores (Matsushima et al, 1998).

Bax es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 que induce apoptosis uniéndose y antagonizando la función inhibidora de Bcl-2. La relación entre Bax y Bcl-2 determina la supervivencia o la muerte de la célula. (Oltvai et al, 1993).

Caspasa-1, también llamada ICE o *Interleukin-1 beta-converting enzyme*. Media una gran variedad de respuestas inmunes e inflamatorias. Además, puede promover apoptosis y es inhibible específicamente por la proteína CrmA del cowpox virus (Thornberry et al, 1992) (Cerretti et al, 1992).

La **caspasa-4** está implicada en la ejecución de la apoptosis. Se activa por un proceso autocatalítico, o bien mediado por la caspasa-8, y degrada a la caspasa-1 (Faucheu et al, 1995).

Fas (también llamado **CD95** o **APO-1**) es el miembro número 6 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Contiene un dominio de muerte (DD) y juega un papel central en la regulación de determinadas vías apoptóticas. En respuesta a la interacción con su ligando promueve la formación de un complejo de señalización inductor de muerte, llamado DISC, que también incluye a la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*) y las caspasas-8 y -10. La activación proteolítica de estas proteasas dentro del complejo, induce la cascada de caspasas que dan lugar a la apoptosis (Itoh et al, 1991) (Oehm et al, 1992).

Granzima B pertenece a la familia de peptidasas S1, subfamilia de granzimas y es necesaria para inducir lisis celular en respuestas inmunes. Esta proteasa es capaz de procesar a las caspasas 3, 7, 9 y 10 promoviendo su activación para provocar apoptosis (Schmid & Weissmann, 1987), (Caputo et al, 1988) (Trapani et al, 1988).

VDAC1 (canal aniónico dependiente de voltaje isoforma 1). Pertenece a la familia de porinas mitocondriales eucarióticas. Forma un canal a través de la membrana mitocondrial externa que permite la difusión de pequeñas moléculas hidrofílicas y también actúa en la membrana plasmática regulando el volumen celular. Se cree que en la mitocondria participa en la formación del complejo del poro de transición de permeabilidad (**PTP**) responsable de la liberación de una serie de proteínas mitocondriales localizadas en el espacio intermembrana encargadas de inducir apoptosis (Blachly-Dyson et al, 1993) (Verrier et al, 2003). (Ver **Introducción**)

4. Identificación de distintos tipos de muerte celular

A través del análisis mediante microscopía de fluorescencia de los cambios morfológicos producidos en las células transfectadas con los clones de la genoteca, se observó que la gran mayoría de ellos inducían las alteraciones típicas de los procesos apoptóticos. Sin embargo, se encontró también un considerable número de clones que provocaban alteraciones atípicas que sugerían modalidades alternativas de **PCD**. De este modo, se identificaron 12 moléculas que provocaban una intensa vacuolización citoplasmática (modo de muerte vacuolado, **Tabla 1**), y otras 14 moléculas que inducían morfología globular y colapso del contenido celular (modo de muerte globular, **Tabla 1**). Ejemplos representativos de estos fenotipos se muestran en la **Figura 5**.

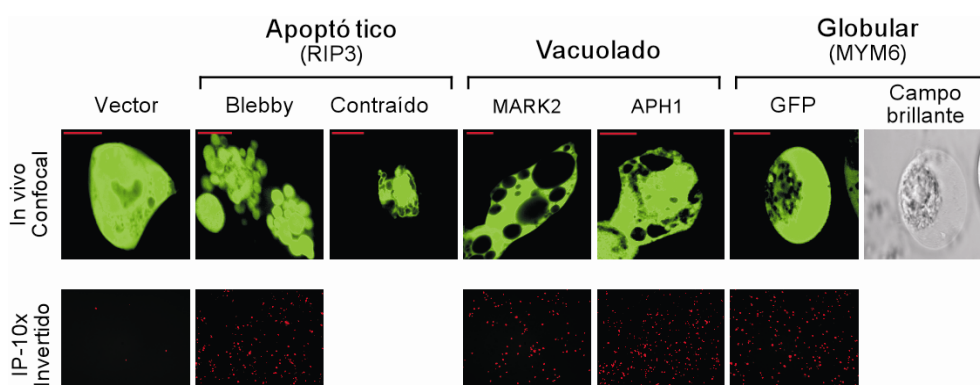


Figura 5. Identificación de diferentes modos de muerte celular. Tres tipos de muerte celular diferenciables morfológicamente: apoptótico, vacuolado y globular. Las células 293T se transfectaron con las moléculas indicadas junto con un plásmido que expresaba GFP, y analizadas *in vivo* por microscopía confocal 36 h después. También fueron marcadas con IP (panel de abajo). Se muestran ejemplos representativos.

4.1. Diferentes procesos de vacuolización

Además, dentro del fenotipo vacuolado se distinguieron dos subcategorías: la vacuolización tipo **I** (o irregular) y tipo **R** (o regular) (**Tabla 1**).

El modelo de vacuolización que se catalogó como irregular (**Tipo I**) se caracterizaba por vacuolas de formas irregulares y que mostraban una distribución perinuclear. Dentro de esta categoría, se identificaron 8 clones cuya sobreexpresión inducía este fenotipo. Como ejemplo de esta categoría se ha tomado la proteína **APH1** (vacuolado tipo I, **Figura 5**).

APH1 (*pharynx defective 1 homolog*) es una proteína transmembrana que interacciona con presenilina y nicastrina, y presenta 2 homólogos en humanos, a y b. Constituye uno de los componentes esenciales del complejo presenilina-gamma-secretasa que es necesario para la proteólisis de un gran número de proteínas de membrana, incluyendo Noch y el precursor de la proteína beta-amiloide (APP), que libera un péptido neurotóxico implicado en la enfermedad de Alzheimer (Saito & Araki, 2005).

Por otro lado, las vacuolas que se denominaron regulares (**Tipo R**) se caracterizaban por una forma redondeada y una distribución homogénea a lo largo de todo el citoplasma. Se identificaron 4 moléculas cuya sobreexpresión provocaba este fenotipo, entre las cuales se encuentra la proteína **MARK2**, (vacuolado tipo R, **Figura 5**).

MARK2 (*microtubule affinity-regulated kinase-2*) forma parte de la familia EMK (ELKL *Motif Kinase*). Es una pequeña familia de serin-treonin quinasas implicada en el control de la polaridad celular, en la estabilidad de los microtúbulos y en cáncer. MARK2 fosforila proteínas asociadas a microtúbulos (proteínas tau) en la degeneración neurofibrilar de la enfermedad de Alzheimer (Panneerselvam et al, 2006) (Marx et al, 2006).

4.1.1. Origen subcelular de las vacuolas

Los fenómenos de vacuolización citoplasmática, se asociaron comúnmente a procesos de muerte celular tanto apoptótica como atípica, y en muchos casos se ha demostrado que el retículo endoplasmático (RE) es el origen de estas vacuolas (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002) (Broker et al, 2005). Para comprobar si las

vacuolas generadas por la sobreexpresión de las proteínas **APH1** y **MARK2** procedían del retículo, se cotransfectaron los vectores que expresaban estas moléculas junto con una versión de la proteína **RFP** (proteína fluorescente roja, del inglés *red fluorescence protein*) que se expresa exclusivamente en las cisternas reticulares, (**reRFP**: (Klee & Pimentel-Muinos, 2005)), y que se empleó como marcador reticular. Mediante microscopía confocal se observó que las vacuolas irregulares (**Tipo I**) inducidas por la proteína APH1, se presentaban rellenas de este marcador, revelando su origen reticular (**Figura 6**). Por otro lado, las vacuolas redondeadas (**Tipo R**) provocadas por la sobreexpresión de MARK2 excluían la reRFP (**Figura 6**), indicando que no tenían origen reticular y que ambos tipos de vacuolización eran, de hecho, diferentes.

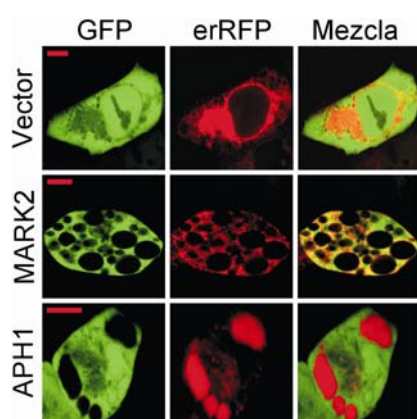


Figura 6. Dos procesos de vacuolización distinguibles por su origen subcelular. Las células 293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados y analizadas 36 h después *in vivo* por microscopía confocal.

4.2. Inducción de autofagia por la expresión del clon MYM6

Otro tipo de **PCD** que se ha asociado a cambios morfológicos característicos es la muerte autofágica. Este tipo de muerte celular provoca la aparición de células que se desprenden del sustrato y adquieren una apariencia globular (Shimizu et al, 2004).

Uno de los clones identificados cuya sobreexpresión induce este fenotipo corresponde a la proteína **MYM6**.

MYM6 (o ZNF258) es un miembro de la familia MYM que se expresa a niveles elevados en el corazón, músculo esquelético, riñón e hígado (Smedley et al, 1999). Contiene 5 dedos de Zinc, secuencias que han sido implicadas en interacciones proteína-proteína y proteína-ADN (Heldin, 1995). MYM6 se ha propuesto como un posible candidato a gen supresor de tumores en estudios realizados en carcinomas de ovario (Bandera et al, 1997).

Para evaluar si los cambios morfológicos que se observaron por la sobreexpresión de **MYM6** realmente eran provocados por un proceso autofágico, se realizaron una serie de experimentos empleando la molécula **LC3A** como marcador de autofagia. LC3 es una proteína que se transloca específicamente al autofagosoma durante su formación. Simultáneamente, sufre una adición lipídica que hace que migre más rápidamente en geles de poliacrilamida (Mizushima, 2004). Además, los procesos autofágicos, también se caracterizan porque los autofagosomas poseen una doble membrana (Xie & Klionsky, 2007) que se puede detectar mediante microscopía electrónica.

4.2.1. Translocación de LC3A

Para analizar si la sobreexpresión de **MYM6** provocaba la translocación de **LC3A** al autofagosoma, se cotransfectó el plásmido que expresaba **MYM6** en células **HEK-293T**, junto con otro vector que expresaba una versión de **LC3** unida a GFP (**GFP-LC3A**) para poder detectar su localización mediante microscopía de fluorescencia. Este experimento mostró que, efectivamente, la sobreexpresión de **MYM6** activaba la redistribución de **LC3A** a las estructuras vesiculares (**Figura 7**, panel superior).

4.2.2. Adición lipídica

Para detectar si la proteína **LC3A**, además de su relocalización a los autofagosomas debida a la sobreexpresión de **MYM6**, también sufría la adición lipídica típica de los procesos autofágicos, se contransfectaron células **HEK-293T** con el vector que expresa **MYM6** y otro que contenía una versión de LC3A marcada con el epítipo HA (**HA-LC3A**), para su posterior inmunodetección. Mediante análisis por *western blot* con un anticuerpo anti-HA, se observó una aparente disminución en el peso molecular de la proteína **HA-LC3A** inducida por MYM6, compatible con el efecto esperado por el fenómeno de adición lipídica (**Figura 7**, panel central).

Tanto la redistribución de **GFP-LC3A**, como la simulada reducción en el peso molecular de **HA-LC3A**, se dan a un nivel comparable al de la proteína proautofágica conocida **NIP**, que se empleó como control positivo (Kanzawa et al, 2005).

4.2.3. Aparición de vesículas de doble membrana

Con objeto de detectar si la sobreexpresión de MYM6 induce la aparición de vacuolas con doble membrana que son típicas de la autofagia, se transfectaron células HEK-293T con un plásmido de expresión que codifica para MYM6 y se sometieron posteriormente a microscopía electrónica. Este ensayo reveló la proliferación de vesículas citoplasmáticas de doble membrana confirmando la existencia de un proceso autofágico (**Figura 7**, panel inferior).

Todos estos resultados apuntan a que la proteína **MYM6** presenta la capacidad de inducir autofagia si se sobreexpresa, sugiriendo que podría estar implicada en las cascadas de señalización que regulan el proceso autofágico de forma fisiológica. Además, estos datos indican que la morfología globular producto de su sobreexpresión es probablemente la consecuencia de un proceso autofágico que resulta en muerte celular tal y como ha sido descrito previamente (Shimizu et al, 2004).

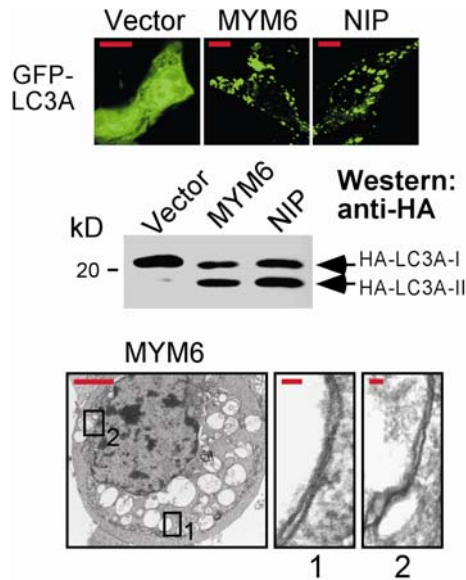


Figura 7. La expresión de MYM6 induce autofagia. Se transfectaron células 293T con los plásmidos indicados junto con un vector que expresaba GFP-LC3A (panel de arriba) o HA-LC3A (panel central), y otro plásmido que expresaba el inhibidor de caspasas p35 para reducir la apoptosis inducida por NIP. Después de 36 h, las células se fijaron y analizaron por microscopia confocal (panel superior), fueron lisadas para someterlas a *western-blot* (panel central), o fijadas para microscopia electrónica (panel inferior; el tamaño de las barras representa 2 μ m (izquierda) o 40 nm (insertos 1 y 2)).

4.3. Implicación diferencial de las caspasas en las distintas modalidades de muerte celular

Los diferentes modos de muerte celular se pueden distinguir, además de morfológicamente, por sus diferentes grados de dependencia a las caspasas (Broker et al, 2005). Para comprobar si los procesos de PCD morfológicamente diferentes que eran inducidos por las moléculas clonadas podían ser diferenciados también por su susceptibilidad a inhibidores de caspasas, se trataron células **HEK-293T** previamente transfectadas con estos clones, con un inhibidor de caspasas de amplio rango como **zVAD.fmk**. Como cabía esperar, la muerte celular inducida por la sobreexpresión de la molécula **RIP3**, que es un conocido inductor de apoptosis, se inhibió casi completamente por el tratamiento con **zVAD.fmk** (**Figura 8**). Sin embargo, las proteínas **APH1** y **MARK2**, ambas inductoras de un tipo de muerte acompañado de vacuolización citoplasmática, se mostraron parcialmente resistentes (**Figura 8**). Finalmente, en el caso de **MYM6**, el clon que parecía estar asociado a muerte autofágica, se observó una completa insensibilidad al inhibidor, mostrando así que el

proceso de muerte celular activado por la sobreexpresión de **MYM6** es independiente de las caspasas (**Figura 8**).

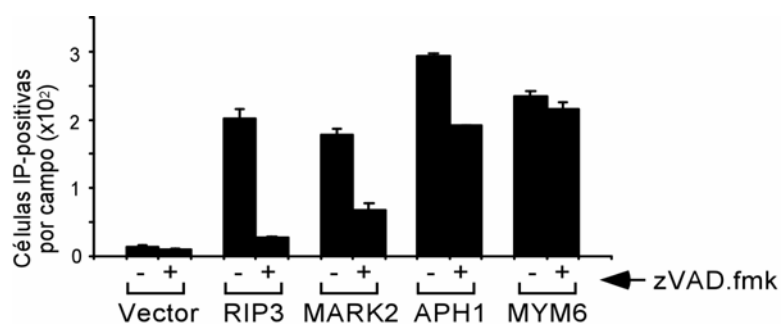


Figura 8. Implicación de las caspasas en los diferentes tipos de muerte. Se transfectaron células 293T como se indica y se trataron con zVAD.fmk (50 μ M) 4 h después de ser transfectadas. Pasadas 36 h, se contó el número de células positivas para ioduro de propidio en un ensayo ciego. Al menos se contabilizaron hasta 600 células por cada punto experimental. La barra de errores indica las desviaciones estándar de los porcentajes obtenidos contando al menos 8 campos diferentes.

Aunque no se analizaron sistemáticamente todos los clones para evaluar la correlación entre las distintas morfologías mortales (apoptótica, vacuolada y globular) y los parámetros estudiados (origen de la vacuolización, inducción de autofagia y dependencia de caspasas), los resultados obtenidos hasta este punto indican que se habían clonado moléculas capaces de inducir diferentes tipos de muerte celular.

II. FAMILIA DE TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES

Dentro de los clones que inducían alteraciones morfológicas típicas de los procesos apoptóticos se encontraron cuatro miembros de la familia de transportadores mitocondriales (**Tabla 1**), un grupo de proteínas implicadas en el transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna. En humanos, esta familia de moléculas está codificada por los genes SLC25 (*human mitochondrial solute carrier gene family*) (Palmieri, 2004).

Dos de los cuatro miembros clonados, el transportador de fosfato (**PIc**) y la isoforma 3 del transportador del nucleótido adenina (**ANT3**), muestran la estructura clásica de la familia con tres dominios homólogos de aproximadamente 100 aminoácidos (Palmieri, 2004). Sin embargo, los otros dos, **MTCH1** y **MTCH2** (*mitochondrial carrier homolog 1 y 2*, respectivamente), presentan una estructura atípica con un único dominio de homología (Yerushalmi et al, 2002).

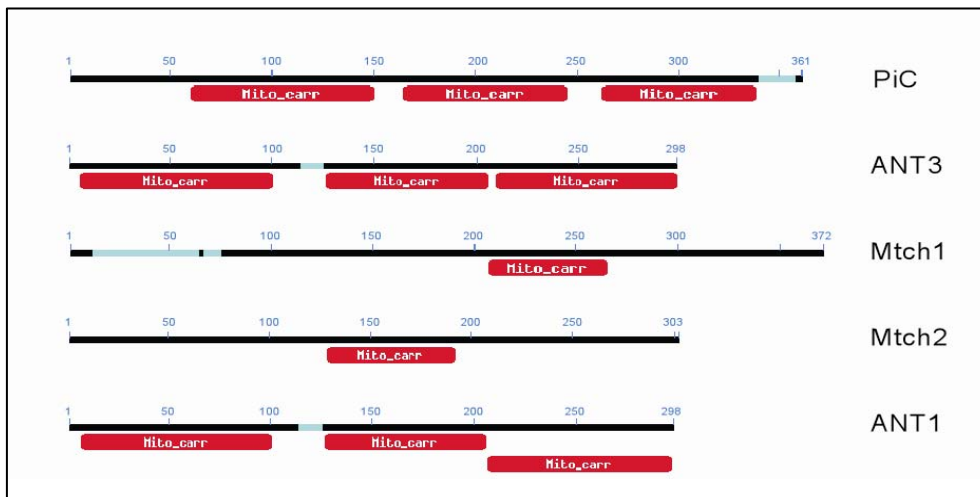


Figura 9. Estructura transportadores mitocondriales.

- **PiC** (transportador de fosfato, del inglés *phosphate carrier*) cataliza el transporte de fosfato a la matriz mitocondrial, un proceso esencial para la fosforilación oxidativa de ADP a ATP. El **PiC** está codificado por el gen SLC25A3 y se han identificado dos isoformas en humanos generadas por *splicing* alternativo, A y B (Dolce et al, 1994). Ambas isoformas muestran propiedades similares en cuanto a especificidad de sustrato y sensibilidad a los inhibidores. Sin embargo, la principal diferencia se localiza en los parámetros cinéticos. La afinidad de la isoforma A para transportar fosfato, es 3 veces mayor que la isoforma B. Además, la tasa máxima de transporte de la isoforma B, es tres veces mayor que la de A (Fiermonte et al, 1998) La molécula clonada en este *screening* corresponde a la isoforma B. Defectos en el gen SLC25A3 causan la llamada deficiencia del transportador de fosfato mitocondrial (MPCD, *mitochondrial phosphate carrier deficiency*), un desorden patológico de la fosforilación oxidativa. Estos pacientes presentan acidosis láctica, cardiomiopatía hipertrófica, hipotonía muscular y mueren en el primer año de vida (Mayr et al, 2007).
- **ANT3** está codificado por el gen SLC25A6 y es una de las 4 isoformas que se conocen del transportador del nucleótido adenina (**ANT**) en humanos (ver **Introducción**). A esta isoforma se le asignó previamente una función proapoptótica en experimentos de sobreexpresión, que además era inhibible por el **ácido bongcrékico** y la **cliclosporina A** (Zamora et al, 2004), dos reguladores negativos del poro de transición de permeabilidad (**PTP**), sugiriendo su implicación en dicho poro al igual que ya se había establecida para su homólogo y miembro prototípico de la familia de transportadores mitocondriales, **ANT1** (Bauer et al, 1999). Esta función de ambas moléculas contrasta con la falta de actividad proapoptótica de su homólogo **ANT2** (Zamora et al, 2004). En el caso de la última isoforma identificada, **ANT4** (Dolce et al, 2005) aún no se ha descrito ningún papel en apoptosis.
- **MTCH1** es otro miembro de la familia de transportadores mitocondriales que fue clonado originalmente como una proteína que interacciona con la presenilina-1 y, por este motivo, se le conoce también como PSAP (proteína

de asociación a presenilina, del inglés *presenilin-associated protein*). Esta proteína presenta dos isoformas generadas por *splicing* alternativo: PSAP_L (isoforma larga) y PSAP_S (isoforma corta). Se ha visto previamente que MTCH1 induce apoptosis activada por sobreexpresión (Xu et al, 2002), y posee dos regiones independientes en la zona N-terminal que son las responsables de esta actividad proapoptótica (Lamarca et al, 2007).

- **MTCH2** es un miembro de la familia de transportadores mitocondriales que se identificó como un ARNm inducido por el factor de crecimiento de hepatocitos (**HGF**) (Yerushalmi et al, 2002). Forma un complejo proteico que, bajo la inducción de **TNF- α** , recluta a las proteínas proapoptóticas **Bid** y **Bax**, incorporación parcialmente inhibida por **Bcl-X_L**. Estos datos muestran una actividad de **MTCH2** como diana mitocondrial de **Bid** sugiriendo una posible implicación del transportador en la ruta apoptótica mitocondrial (Grinberg et al, 2005).

Como ya se ha comentado, estos 4 transportadores fueron identificados como inductores de la morfología apoptótica clásica, aunque de forma interesante, en el caso de **MTCH2** se observó un proceso de vacuolización citoplasmática que precedía a la aparición de los signos apoptóticos (**Tabla 1**).

1. Localización subcelular de los transportadores

Una característica ya mencionada de los miembros de la familia de transportadores mitocondriales es que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Para comprobar si los transportadores clonados mostraban localización mitocondrial, se cotransfectaron cada uno de los vectores que expresaban estos 4 clones marcados con **AU**, en células **HEK-293T**, junto con un plásmido que contenía una versión de GFP unida a una secuencia de localización mitocondrial (**mGFP**). Mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-AU y microscopía de fluorescencia,

se demostró que todos los transportadores colocalizaban con mGFP (**Figura 10**) indicando que, efectivamente, se expresaban en la mitocondria.

En el caso de **MTCH2**, además de marcaje mitocondrial, se observó lo que parecía ser un patrón reticular (no se muestra). Dado que el proceso de vacuolización inducido por **MTCH2** previamente a la aparición de la morfología apoptótica, fue catalogado dentro del **tipo I**, y se ha observado que estas vacuolas parecen ser originadas por una dilatación del retículo endoplasmático (ver apartado de **Origen subcelular de las vacuolas**), no es de extrañar que **MTCH2** muestre localización parcialmente reticular.

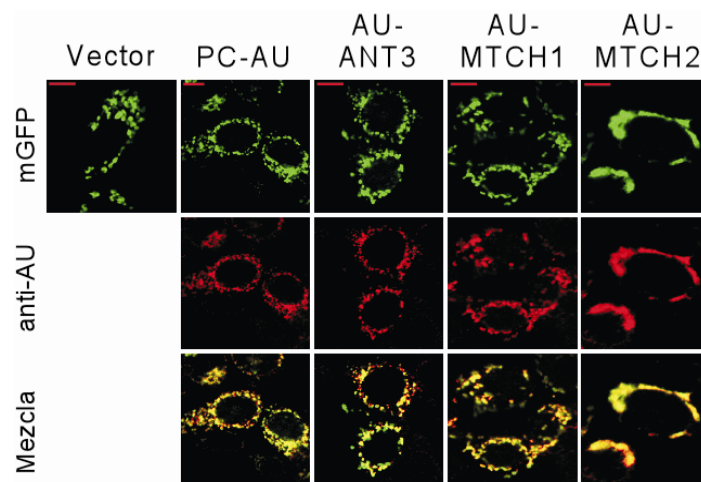


Figura 10. Localización subcelular de los transportadores. Células HEK-293T cotransfectadas con mGFP junto al transportador indicado marcado con AU, y sometidas a inmunofluorescencia anti-AU (rojo).

2. Capacidad de los transportadores para activar las rutas apoptóticas mitocondriales

2.1. Similitudes con ANT

El transportador del nucleótido adenina **ANT1** está codificado por el gen SLC25A4 (Palmieri, 2004) y se ha establecido como el miembro prototípico de la familia de transportadores mitocondriales. Además de transferir ATP de la matriz mitocondrial al citoplasma, se propuso como componente estructural del poro de transición de permeabilidad (**PTP**), junto con el canal situado en la membrana mitocondrial externa **VDAC** y a la proteína de la matriz mitocondrial **ciclofilina D** (Zamzami & Kroemer, 2001) (Crompton et al, 2002). La participación de estas 3 proteínas en el **PTP** está apoyada por un gran número de evidencias farmacológicas, aunque datos genéticos más recientes han abierto un intenso debate respecto a la composición de dicho poro (ver **Introducción**).

El **PTP** es un complejo macromolecular mitocondrial que media apoptosis induciendo un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna. Éste fenómeno permite la entrada de agua y solutos que finalmente se traduce en un hinchamiento de la matriz, provocando la rotura de la membrana mitocondrial externa y la salida de factores apoptogénicos (entre los cuales se encuentra el **citocromo c**) que finalmente desencadenan todo el proceso que conduce a la muerte celular (Brenner & Grimm, 2006). De modo consistente con esta función proapoptótica del **PTP** y con la propuesta participación del **ANT1** en dicho poro, se ha demostrado que la sobreexpresión de **ANT1** induce apoptosis (Bauer et al, 1999).

Dado que existen características, tanto estructurales como funcionales, compartidas por los transportadores mitocondriales clonados y **ANT1** se planteó la posibilidad de que todos ellos pudieran desempeñar una función similar dentro de los procesos apoptóticos. Asimismo, la actual controversia respecto a la composición real del **PTP**, y la inclinación de diversos autores a proponer un poro de composición flexible en diferentes condiciones (Zoratti et al, 2005) (Halestrap, 2004), abre la

posibilidad de que tanto PiC como MTCH1 y 2 pudieran representar nuevos miembros participantes en el PTP.

2.2. La sobreexpresión de los transportadores induce apoptosis

En primer lugar, se estableció la capacidad de los transportadores para activar apoptosis clásica. Para ello se analizaron dos fenómenos bioquímicos que son característicos del proceso apoptótico: el procesamiento proteolítico del sustrato de caspasa-3, poli-(ADP-ribosa) polimerasa (**PARP**), y la aparición de la **escalera de degradación del ADN** (*low molecular weight DNA ladder*). Esta escalera se produce debido a la liberación de endonucleasas que cortan el ADN genómico en múltiples fragmentos internucleosómicos de aproximadamente 200 pares de bases. Estas fracciones de ADN, al ser resueltas en un gel de electroforesis, muestran un patrón característico en escalera, con fragmentos discretos del tamaño de un nucleosoma y múltiplos (Evan & Littlewood, 1998).

Mediante transfección en células **HEK-293T** y posterior análisis por *western blot*, se demostró que la sobreexpresión de todos los transportadores inducía el procesamiento proteolítico de **PARP**. Para la inmunodetección se empleó un anticuerpo monoclonal anti-PARP capaz de detectar tanto la forma nativa de 116 KDa, como el fragmento de 85 KDa generado tras el procesamiento llevado a cabo por la **caspasa-3** (**Figura 11 b**).

También se pudo observar que la capacidad de las moléculas para activar la degradación de **PARP** era mayor en todos los casos a la de **ANT2**, un miembro inactivo de la familia (**Figura 11 b**; (Bauer et al, 1999)).

Además se comprobó que la sobreexpresión de todos los transportadores daba lugar a la aparición de la escalera típica de degradación de ADN (*DNA ladder*) ((**Figura 11 a**)).

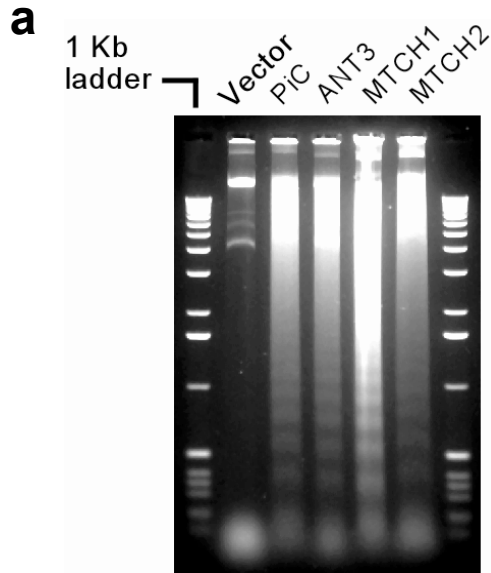
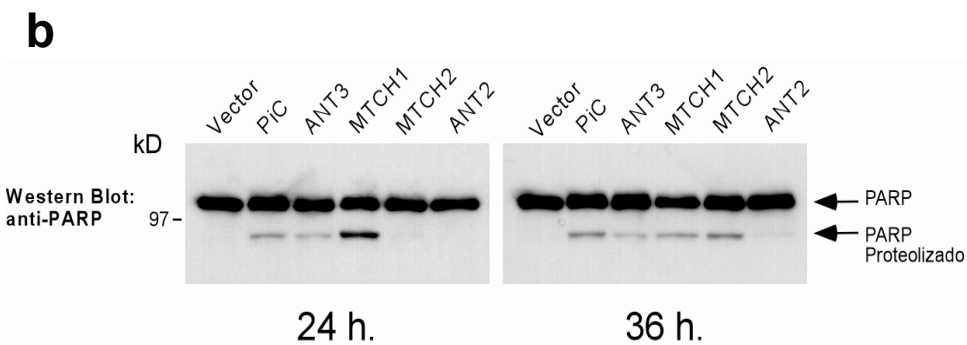


Figura 11. La expresión de los transportadores mitocondriales activa la apoptosis. (a) Inducción del procesamiento de PARP. Células 293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados, lisadas a los tiempos indicados y sometidas a *western blot* anti-PARP. **(b)** Aparición de la escalera de degradación del ADN (*DNA ladder*). Las células se transfectaron como en **(a)** y fueron lisadas a las 36 h. El ADN se resolvió en un gel de agarosa al 1%.



2.3. Susceptibilidad de diferentes tipos celulares

Para demostrar que la actividad proapoptótica de los transportadores no era exclusiva de las células **HEK-293T**, línea celular en la que se habían realizado todos los experimentos hasta el momento, se ensayaron otros tipos celulares. La sobreexpresión de las moléculas en las líneas celulares **HeLa** y **HCT116**, reprodujo los cambios morfológicos observados en **HEK-293T**. Con el fin de obtener un análisis cuantitativo, se cotransfectaron los transportadores junto con **GFP** y mediante microscopia de fluorescencia se realizaron contajes para obtener el porcentaje de células que mostraban morfología apoptótica respecto al total de células

transfectadas que expresaban **GFP** (Figura 12). Estos resultados confirman que la apoptosis inducida por la sobreexpresión de los transportadores no es un efecto específico de un único tipo celular.

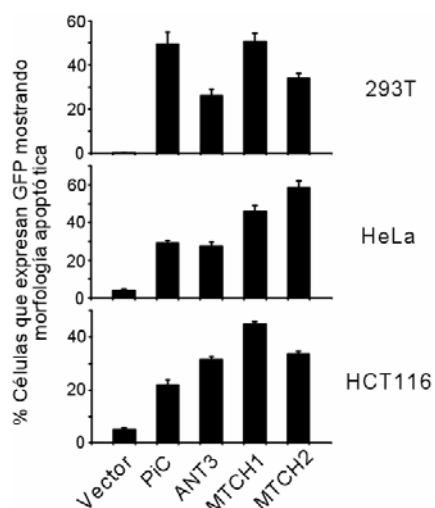


Figura 12. Susceptibilidad de diferentes tipos celulares a la apoptosis inducida por los transportadores. Las células se transfectaron con los plásmidos indicados mezclados con un vector que expresaba GFP. 36 h después, la proporción de células que expresaban GFP y mostraban morfología apoptótica se determinó *in vivo*. Los contajes y estadísticas se realizaron del mismo modo que en la Figura 8.

Todos los resultados anteriores, en su conjunto, confirman la capacidad de los transportadores clonados de inducir apoptosis de forma canónica, y reproducen estudios previos en los que ya se había adscrito un potencial proapoptótico a **MTCH1** y **ANT3**, (Xu et al, 2002) (Zamora et al, 2004).

2.4. Inducción de la vía apoptótica mitocondrial

Con el fin de investigar la vía de señalización apoptótica en la que están implicados estos transportadores, se cotransfectaron en células **HEK-293T** junto con vectores que expresaban inhibidores conocidos del proceso apoptótico. Como inhibidores se emplearon la proteína viral **p35**, inhibidora general de caspasas, y una versión mutada de la caspasa-9 (**C9-DN**) que presenta capacidad para actuar como reguladora dominante-negativa. La caspasa-9 es la principal caspasa activada por la

Resultados

salida de **citocromo c** de la mitocondria y, por tanto, está críticamente implicada en las vías apoptóticas intrínsecas (Green & Reed, 1998). El análisis por *western blot* e inmunodetección con el anticuerpo anti-PARP, mostró que tanto **C9-DN** como **p35**, bloqueaban el procesamiento de **PARP** inducido por la sobreexpresión de los transportadores (**Figura 13**).

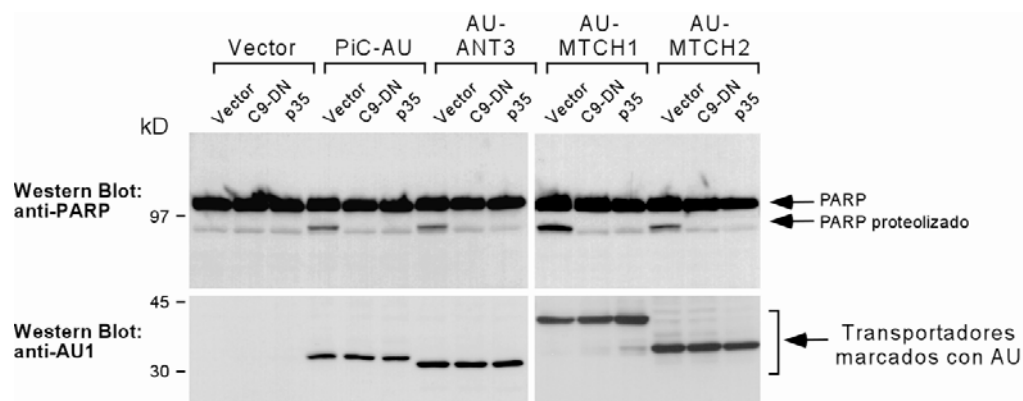


Figura 13. El procesamiento de PARP se bloquea por una versión de la caspasa-9 con actividad dominante-negativa y p35. Se transfectaron células 293T con las construcciones indicadas. 36 h después, las células se sometieron a *western blot* anti-PARP (panel superior) o anti-AU1 (panel inferior).

2.5. Inducción de la salida de citocromo c mitocondrial por la sobreexpresión de los transportadores

Los resultados anteriores demuestran la participación de las caspasas en la muerte celular activada por estos transportadores. La inhibición por **C9-DN**, además, revela la implicación de la **caspasa-9** en estas rutas y, por tanto, de las vías apoptóticas mitocondriales. Dado que la salida de **citocromo c** de la mitocondria es el fenómeno que activa a la **caspasa-9** (Green & Reed, 1998), se estudió si la sobreexpresión de los transportadores era capaz de inducir la liberación de este factor apoptogénico.

Para ello, se transfectaron células **HEK-293T** con los plásmidos que contenían los transportadores junto a un vector que expresaba GFP en la mitocondria (**mGFP**). Posteriormente, mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-citocromo *c*, se comprobó que la sobreexpresión de los transportadores provocaba la salida de **citocromo c** desde el espacio intermembrana (**Figura 14**). Se interpretó como liberación de **citocromo c**, la pérdida de colocalización entre el anticuerpo (marcado en rojo) y la **mGFP** (en verde), y la aparición a cambio de una señal difusa del anticuerpo por todo el citoplasma. Finalmente se realizaron contajes para obtener el porcentaje de células con **citocromo c** citoplasmático frente al total de células transfectadas que expresaba **mGFP** en la mitocondria.

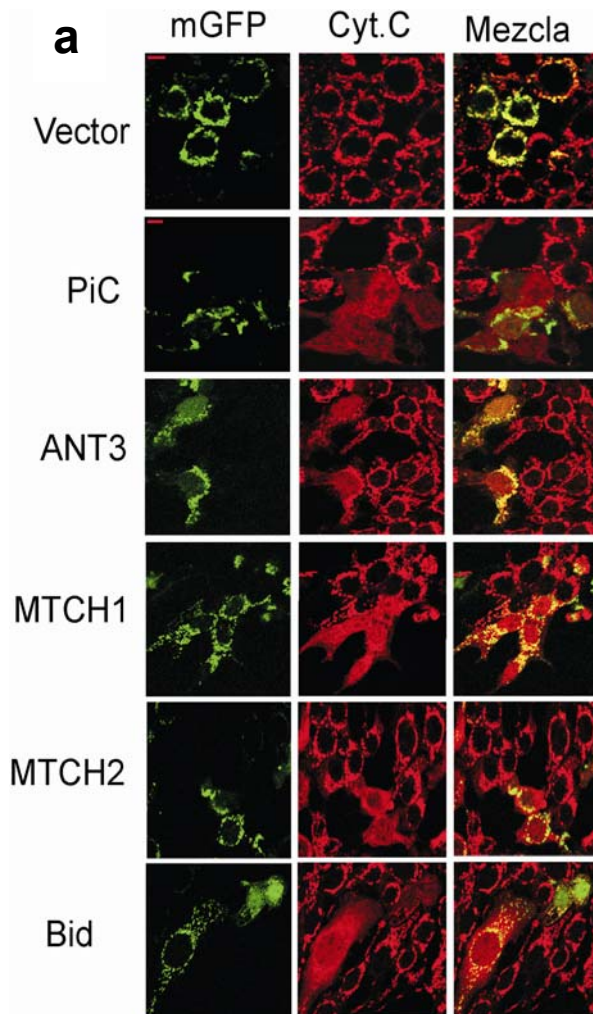
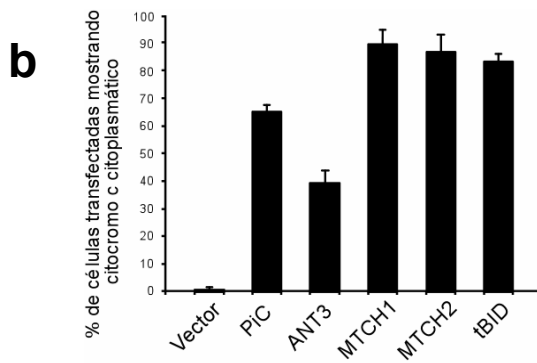


Figura 14. Inducción de la liberación de citocromo c. (a)

Se transflectaron células 293T con las construcciones indicadas junto con plásmidos que expresaban la proteína fluorescente mitocondrial (mGFP) y p35, y 36 h después, fueron marcadas con anti-citocromo c. Se obtuvieron fotografías mediante microscopía convocal del marcaje producido por los transportadores (b) El porcentaje de células transfectadas que mostraban movilización del citocromo c se determinó contando las células que expresaban mGFP y mostraban una señal del anticuerpo difusa (rojo). Los contajes y estadísticas se llevaron a cabo de igual modo que en la **Figura 8**.



2.6. La apoptosis inducida por los transportadores es inhibible por miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2

Los miembros antiapoptóticos de la familia **Bcl-2** (**Bcl-2** ó **Bcl-X_L**) (Green & Reed, 1998) protegen a las células de la apoptosis inducida por una gran variedad de estímulos, incluida la muerte provocada por la sobreexpresión de **ANT1**, uno de los componentes del **PTP** (Schubert & Grimm, 2004). Evidencia previa indica que una de ellas (**Bcl-X_L**) parece actuar inhibiendo el **PTP** a través de su unión a **VDAC** y bloqueando su actividad, impidiendo así la liberación del **citocromo c** en determinadas condiciones (Marzo et al, 1998b).

Para analizar si este inhibidor apoptótico bloqueaba la muerte celular inducida por los transportadores, éstos se cotransfectaron junto con un plásmido que expresaba **Bcl-X_L** en células **HEK-293T**. Mediante análisis por *western blot* con un anticuerpo anti-PARP, se comprobó que **Bcl-X_L** inhibía el procesamiento de **PARP** inducido por la sobreexpresión de todos los transportadores, mostrando un efecto más pronunciado en el caso de **PiC** y **MTCH2** (Figura 15).

Estos resultados muestran que los transportadores mitocondriales clonados inducen un proceso apoptótico similar al inducido por **ANT1**, un miembro clásico del **PTP**. Así, todos ellos provocan la salida de **citocromo c** de la mitocondria e inducen muerte celular inhibible, tanto por el dominante negativo de la **caspasa-9**, como por un regulador negativo del **PTP**, la proteína antiapoptótica **Bcl-X_L**.

Todos estos datos sugieren una posible participación de los transportadores clonados en el **PTP**.

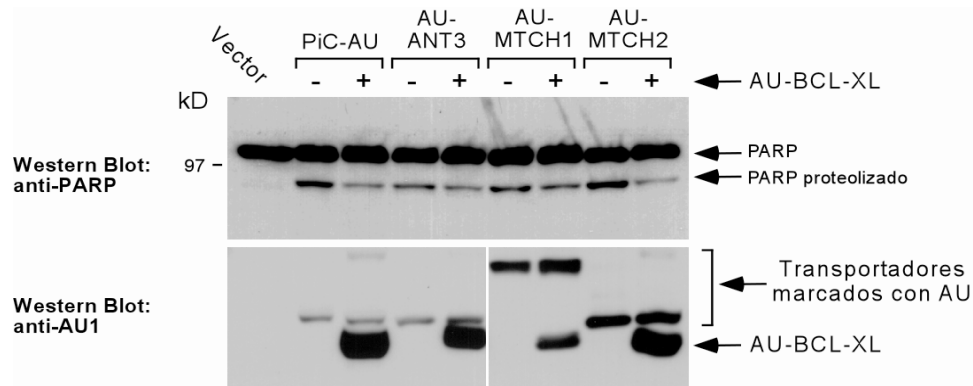


Figura 15. El procesamiento de PARP se ve inhibido por Bcl-X_L. Las células 293T se transfectoron con las construcciones indicadas y fueron procesadas como en (a). Se muestran los *western blots* anti-PARP (panel superior) o anti-AU (panel inferior). Los *blots* que contenían PiC y ANT3, o MTCH1 y 2 se corrieron en geles de diferente porcentaje para maximizar la resolución con AU-Bcl-X_L.

3. Implicación de los transportadores en el PTP

3.1. Interacción entre los transportadores y ANT1 o VDAC1

Para explorar si los transportadores mitocondriales clonados participan físicamente en el **PTP**, se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación entre los transportadores y algunos componentes establecidos del **PTP**. Aunque estudios genéticos recientes apunten a que **ANT** y **VDAC** sean moléculas prescindibles dentro de la composición del **PTP** (Kokoszka et al, 2004) (Baines et al, 2007), un gran número de aproximaciones farmacológicas argumentan a favor de su participación en dicho poro (Zamzami & Kroemer, 2001) (Shimizu et al, 2001) (Tsujimoto et al, 2006).

En primer lugar, se transfectoron células **HEK-293T** con vectores que codifican para las versiones marcadas con el epítipo **AU** de los transportadores, y las proteínas **ANT1** o **VDAC1** unidas al epítipo **HA**. Posteriormente, se lisaron las células y se sometieron los extractos celulares obtenidos a inmunoprecipitación con

una matriz de agarosa conjugada a un anticuerpo **anti-HA** de tal modo que, **HA-ANT1** o **HA-VDAC1** se unían a la matriz y precipitaban con ella. Posteriormente, se sometieron los inmunoprecipitados resultantes a un análisis por *western blot* con un anticuerpo **anti-AU**, para detectar si los transportadores marcados con **AU** se habían unido a **ANT1** o **VDAC1** y por tanto habían precipitado con ellos.

En estos ensayos, se detectaron grandes cantidades de **PiC** y **ANT3** transfectados en los inmunoprecipitados con **HA-ANT1** (**Figura 16 a**), mientras que **MTCH1** y **MTCH2** fueron indetectables (**Figura 16 a**).

En un experimento análogo, se observó que los inmunoprecipitados con **HA-VDAC1** contenían **PiC** y **ANT3**, aunque los niveles más altos de señal se dieron con **MTCH2** (**Figura 16 b**). De nuevo, **MTCH1** fue casi indetectable (**Figura 16 b**).

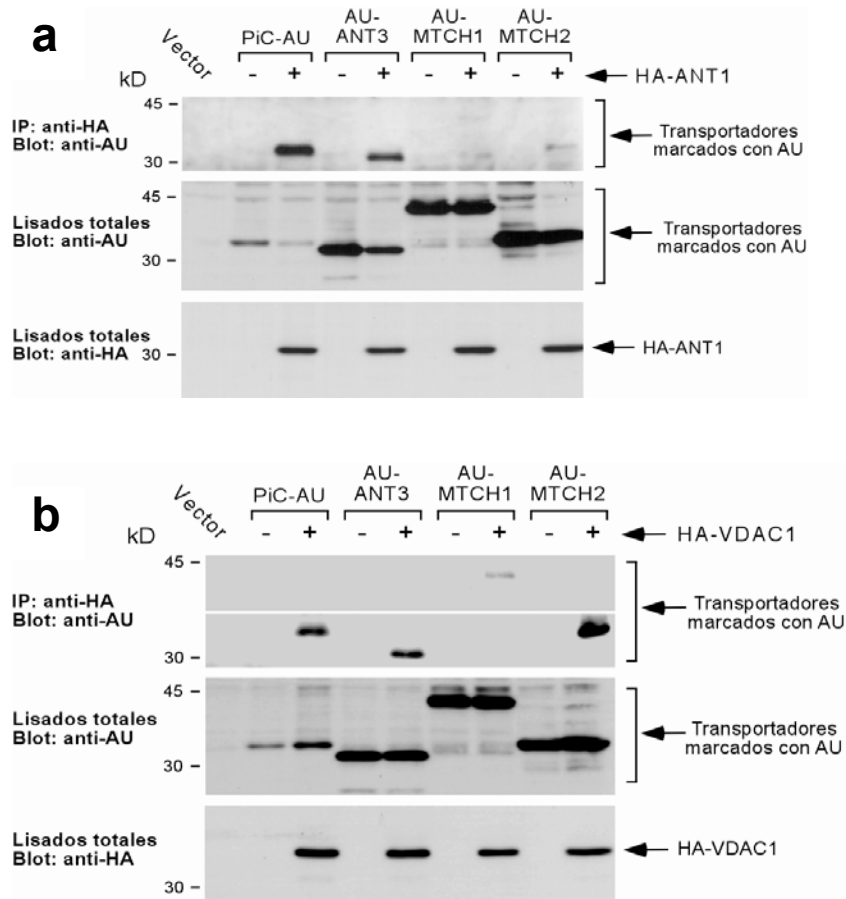


Figura 16. Asociación entre los transportadores y ANT1 o VDAC1. (a) Coimmunoprecipitación entre los transportadores marcados con AU y HA-ANT1. Las células 293T se transfectaron con las construcciones indicadas junto con un plásmido que expresaba p35 y 36 h después, sometidas a inmunoprecipitación anti-HA. Los inmunoprecipitados se incubaron con un anticuerpo anti-AU (panel superior), y los lisados totales con anticuerpos anti-AU (panel central) o anti-HA (panel inferior). (b) Coimmunoprecipitación con HA-VDAC1. Las células se procesaron como en (a). El gel de inmunoprecipitación fue horizontalmente dividido para eliminar la señal irrelevante.

De estos resultados se puede concluir que tanto **PiC** como **ANT3** se asocian a **ANT1** y **VDAC1**, mientras que **MTCH2** muestra habilidad para unirse únicamente a **VDAC1**.

Además, estos complejos eran altamente estables, puesto que eran resistentes a lavados en condiciones de elevada salinidad, empleando tampones con concentraciones salinas de hasta 0,9 M.

Todos estos resultados llevaron a considerar que los transportadores **PiC**, **ANT3** y **MTCH2** podrían tener un papel regulador del PTP, a través del cual pudieran controlar el fenómeno apoptótico. Publicaciones previas ya habían descrito la posible implicación de **ANT3** en el PTP, al observar que la apoptosis inducida por su sobreexpresión era inhibible por el tratamiento con ácido bongkrékico (**BA**) y por ciclosporina A (**CsA**) (Zamora et al, 2004). Ambos inhibidores actúan sobre el PTP a través de su interacción con **ANT1**, por lo que estos datos sugerían que tanto **ANT1** como **ANT3** inducían apoptosis a través de un mecanismo similar (Zamora et al, 2004). Por tanto, dado que ya se había investigado una función apoptótica para **ANT3**, nuestros estudios posteriores se centraron en el papel de **PiC** y **MTCH2**.

3.2. Estabilización de la interacción entre **PiC** y **ANT1** en presencia de estaurosporina (**STS**)

A continuación se testó si las interacciones observadas entre estos transportadores y las proteínas del poro aumentaban en respuesta a inductores conocidos de apoptosis, indicando que podrían desempeñar un papel relevante en una ruta apoptótica concreta inducida por un estímulo específico. Para llevar a cabo estos experimentos, se empleó como estímulo apoptótico la **estaurosporina (STS)**, un inductor apoptótico cuya principal actividad biológica es la inhibición de proteínas quinasas a través de una inhibición competitiva de la unión a ATP (Ruegg & Burgess, 1989). Publicaciones previas indican que la STS induce apoptosis a través del PTP mitocondrial (Tafari et al, 2001).

Resultados

Experimentos preliminares indicaron que la **STS** promovía una liberación marginal de **citocromo c** en células **HEK-293T**, mientras que en la línea celular **HeLa** se observó una respuesta masiva (no se muestra). Por este motivo, se eligieron estas últimas células para realizar los ensayos.

Para abordar el experimento, se infectaron células **HeLa** con sobrenadantes de retrovirus capaces de expresar los transportadores **PiC** y **MTCH2** marcados con el epítipo **AU**, y las proteínas del poro **ANT1** o **VDAC1** fusionadas a **HA**. 36 h después, se trataron las células con **STS** durante 1 h, se lisaron y los extractos totales se sometieron a inmunoprecipitación con una matriz de agarosa acoplada a una anticuerpo **anti-HA**. Finalmente se realizó un análisis por *western blot* utilizando un anticuerpo **anti-AU** para detectar la cantidad de **PiC** o **MTCH2** que se habían unido a las proteínas del **PTP**.

La exposición de las células a **STS** durante 1 h, provocó un agudo incremento de la cantidad de **PiC** que coimmunoprecipitaba con **ANT1** (**Figura 17 a**). Sin embargo, en condiciones similares, no se vio ningún aumento de la asociación entre **PiC** o **MTCH2** con **VDAC1** (no se muestra).

Esta interacción entre **PiC** y **ANT1** se había analizado siempre con las proteínas transfectadas, por lo que a continuación se intentaron reproducir estos resultados a nivel de las moléculas endógenas. Desafortunadamente, en el caso del **PiC** que no se disponía de un anticuerpo adecuado para su detección, por lo que fue necesario recurrir a la transducción de las células con la construcción que expresa **PiC-AU**, para su posterior detección mediante el anticuerpo **anti-AU**.

Una vez infectadas las células **HeLa** con sobrenadantes retrovirales que contenían la construcción **PiC-AU** y tratadas 36 h después con **STS** 1 μ M durante 1 h, fueron lisadas e incubadas con un anticuerpo soluble específico para **ANT** que, posteriormente, se inmunoprecipitó con una matriz de agarosa acoplada a proteína **G**. Finalmente, se detectó mediante *wetern blot* con un anticuerpo **anti-AU** la cantidad de **PiC** que se había unido al **ANT** (**Figura 17 b**). Este experimento reprodujo los datos obtenidos al inmunoprecipitar el **ANT1** transfectado, indicando así que el **PiC** también es capaz de unirse al **ANT** endógeno incrementado su asociación bajo el tratamiento con **STS** (**Figura 17 b**).

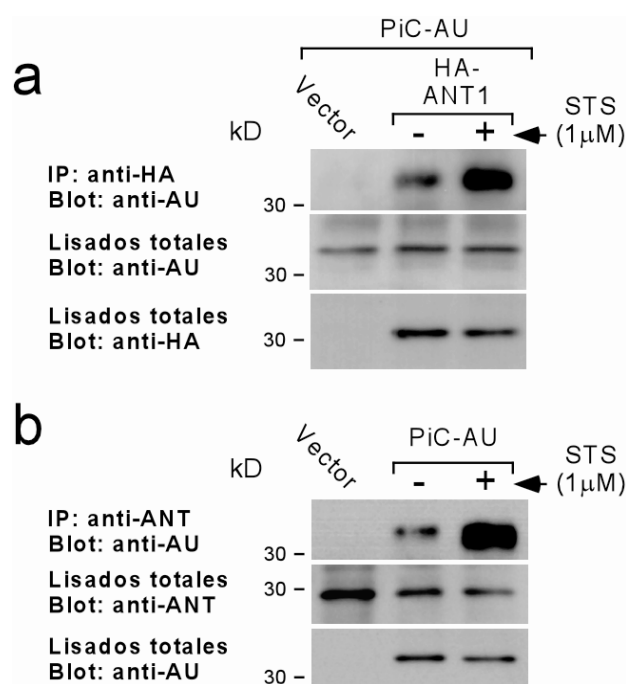


Figura 17. El tratamiento con estaurosporina (STS) potencia la asociación entre PiC y ANT. (a) Incremento de la coimmunoprecipitación entre PiC y ANT1 transfectados. Las células HeLa se transfectaron con las construcciones indicadas y un plásmido que expresaba p35. Después de 36 h, las células se trataron con STS (1 μM) durante 1 h y se sometieron a inmunoprecipitación anti-HA. Los inmunoprecipitados se sometieron a *western blot* anti-AU (panel superior). Los lisados totales se incubaron con anti-AU y anti-HA (panel inferior). **(b)** Incremento en la coimmunoprecipitación entre ANT endógeno y el PiC transducido. Las células HeLa se infectaron retroviralmente con una mezcla de sobrenadantes de virus que contenían PiC-AU y p35, fueron tratadas como en **(a)** y sometidas a inmunoprecipitación anti-ANT. Se muestran los *western blots* anti-AU de los inmunoprecipitados (panel superior). Los lisados totales se incubaron con anti-ANT y anti-AU (panel inferior).

3.3. Relevancia del PiC en la apoptosis inducida por STS

Los resultados anteriores, sugieren que el **PiC** se incorpora al **PTP** durante la apoptosis inducida por **STS**. Para estudiar la relevancia funcional del **PiC** en este contexto, se realizaron ensayos de *knock-down* utilizando ARNs de interferencia (**ARNi**) para silenciar la expresión del transportador. De este mismo modo se evaluó una posible función en este contexto de **MTCH2**, transportador del que se había visto

una fuerte interacción con la proteína del **PTP VDAC**; y lo que sucedía con el silenciamiento de **ANT1**, un mediador con un papel establecido en la apoptosis a través del **PTP**.

3.3.1. Estudio de la salida de citocromo c en células deplecionadas para PiC

En primer lugar, se estudió el efecto de la depleción de **PiC** en la liberación de **citocromo c** inducida por **STS**. Para ello, se transfectaron células **HeLa** con los diferentes ARNis y, 48 h después, se trataron con **STS** durante 3 h. Finalmente, las células se sometieron a inmunofluorescencia con un anticuerpo **anti-citocromo c** y se observó la salida de **citocromo c** de la mitocondria mediante microscopía de fluorescencia, realizando contajes para obtener el porcentaje de células que mostraban señal citoplasmática del anticuerpo respecto al total.

El silenciamiento de **PiC**, resultó en una disminución de células que mostraban movilización del **citocromo c** después del tratamiento con **STS** (**Figura 18 a**), un efecto que se reprodujo con diferentes especies de ARNis (**Figura 18 b**). Estos resultados, apoyan la importancia funcional de **PiC** en la apoptosis inducida por **STS**.

Los niveles reducidos de **ANT1** proporcionaban una protección similar a la de **PiC** (**Figura 18 a**).

En el caso de la disminución de **MTCH2** en cambio, no se observó ninguna resistencia en la salida de **citocromo c** (**Figura 18 a**), indicando que, al menos en la inducción de apoptosis a través de **STS**, este transportador no parece desempeñar un papel relevante.

Como control en estos ensayos se utilizó un ARNi inespecífico que no presenta ninguna diana conocida en el genoma humano.

Las diferentes especies de ARNis utilizados fueron capaces de disminuir sustancialmente la expresión de las moléculas analizadas, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Para los ensayos a nivel de ARNm, se extrajo el **ARN total** de las células que habían sido transfectadas previamente con los ARNis y se amplificaron fragmentos específicos mediante **RT-PCR** semicuantitativa con oligos dirigidos a los

diferentes transportadores. Posteriormente se resolvieron los productos de **PCR** y se comprobó que, efectivamente, se habían reducido prácticamente en su totalidad los niveles de **ARN** de cada transportador (**Figura 18 a**, panel central). Asimismo, se vio que los **ARNi** actuaban específicamente silenciando las dianas para las que habían sido diseñados, puesto que los niveles de actina, que se analizaron como control, no se vieron afectados.

Los ensayos dirigidos a demostrar una reducción en los niveles de proteína endógena de las células transfectadas con los **RNAi**, se abordaron mediante *western blot* con los anticuerpos **anti-MTCH2** y **anti-ANT**. En el caso de **PiC**, debido a la falta de un anticuerpo eficaz para su detección, se transdujeron retroviralmente células **HeLa** con un vector que expresaba **PiC-HA**, y posteriormente se trataron con el **RNAi** específico para **PiC** para analizar el nivel de proteína mediante *western blot* con un anticuerpo **anti-HA**. Finalmente, las membranas fueron rehibridadas con un anticuerpo **anti-actina**, como control de carga. Este resultado mostró que los **RNAi**s habían disminuido eficientemente los niveles de las proteínas a las que estaban dirigidos y que no habían afectado a la expresión de otras proteínas como la actina (**Figura 18 a**, panel derecho y **18 b** panel superior derecho)

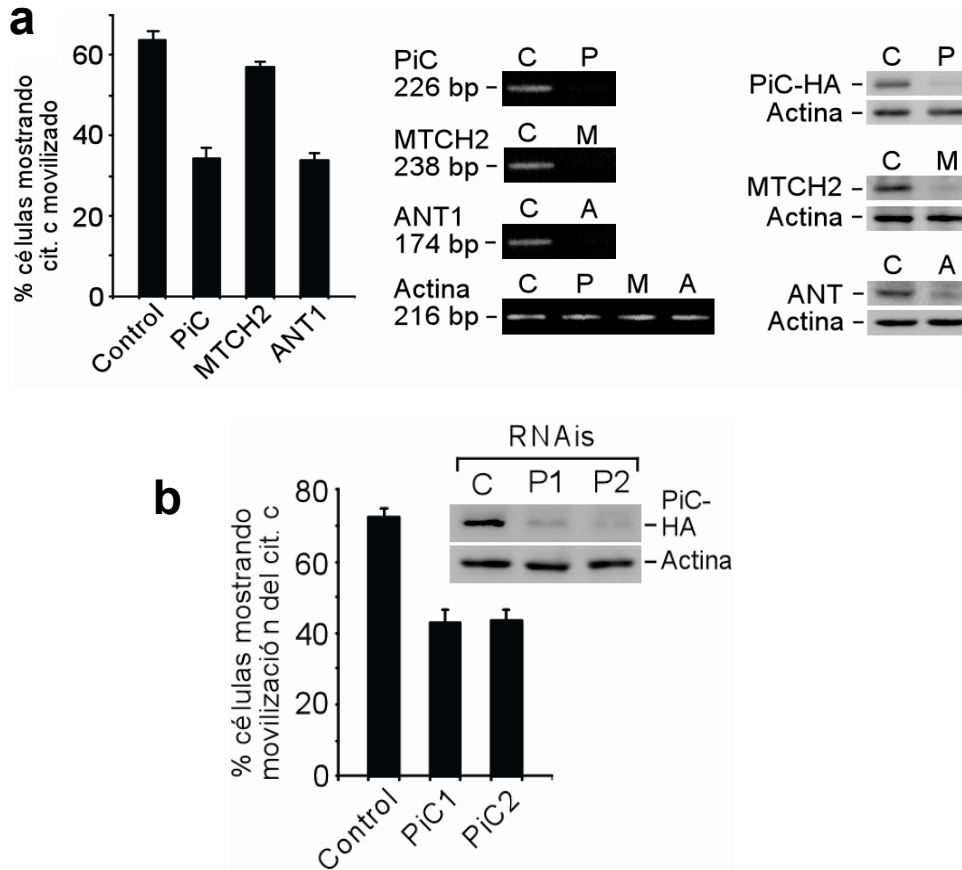


Figura 18. Implicación del PiC en la salida de citocromo c y apoptosis inducida por STS. (a) La depleción de PiC reduce la salida de citocromo c inducida por STS. Las células HeLa se transfectaron con los ARNis indicados, se trataron 48 h después con STS 1 μ M durante 3 h y finalmente fueron marcadas con anti-citocromo c y contadas para establecer el porcentaje de células que mostraban movilización del citocromo c (panel izquierdo). Los contejes y estadísticas se realizaron como en la Figura 8. La RT-PCR semicuantitativa (panel central) y los *western blots* (panel derecho) muestran la depleción específica. C, P, M y A que indican las células transfectadas con el ARNi control, o ARNis dirigidos contra PiC, MTCH2 y ANT1, respectivamente. Los *western blots* muestran las proteínas endógenas excepto el de PiC. En este caso, las células HeLa fueron retroviralmente transducidas con PiC-HA una semana antes de la transfección con los ARNis. Se muestra el *western* anti-HA (panel derecho, cuadro superior). **(b)** Diferentes especies de ARNi contra PiC inhiben la liberación de citocromo c inducida por STS. Las células HeLa fueron procesadas como en **(a)**.

3.3.2. La depleción de PiC disminuye otros parámetros apoptóticos

Además de analizar el impacto que la expresión reducida de **PiC** tenía en la liberación de **citocromo c** durante la apoptosis inducida por **STS**, también se estudiaron otros dos parámetros característicos de los procesos apoptóticos: la condensación de la cromatina nuclear y la activación de caspasas.

Para abordar los ensayos dirigidos a observar cambios en la cromatina se empleó un colorante típico para el marcaje de los núcleos, **DAPI**. Las células **HeLa** previamente transfectadas con el RNAi específico para **PiC**, se trataron con **STS** durante 3 h y posteriormente se marcaron con el colorante **DAPI** que tiñe los núcleos de azul. Mediante análisis por microscopía de fluorescencia y los contajes correspondientes, se demostró que las células deplecionadas para **PiC** experimentaban una reducción en la aparición de núcleos apoptóticos que mostraban la cromatina condensada en respuesta a **STS**, frente a células tratadas con ARNi inespecífico (**Figura 19 a**).

También se observó, mediante *western blot* e incubación con anticuerpos **anti-caspasa-9** y **anti-parp**, el principal sustrato de la **caspasa-3**, que las células **HeLa** deplecionadas para **PiC** y tratadas con **STS**, mostraban una disminución en la activación de ambas caspasas respecto a las células tratadas con ARNi control (**Figura 19 b**).

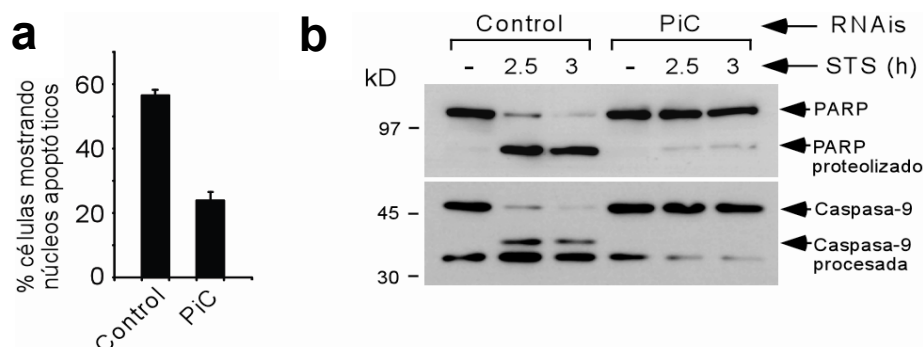


Figura 19. Otros parámetros apoptóticos reducidos por la depleción de PiC. (a) Número reducido de núcleos apoptóticos inducidos por STS en células con PiC deplecionado. Las células HeLa fueron tratadas como en la **figura 18 a**, marcadas con DAPI y contadas para establecer el porcentaje de células que mostraban condensación de la cromatina. Los contejes y estadísticas se realizaron igual que en la **Figura 8**. (b) La depleción de PiC reduce la activación de caspasas inducida por STS. Las células HeLa se transfectaron con los ARNis indicados, y 48 h después tratadas a los tiempos mostrados con STS 1 μ M antes de ser procesadas para *western blot* anti-PARP o anti-caspasa-9.

3.3.3. Polarización mitocondrial normal en células deplecionadas para PiC

Esta disminución en los parámetros apoptóticos inducidos por **STS** debido a la depleción de **PiC** podría ser debida a un efecto inespecífico puesto que la reducción en los niveles de **PiC** podría disminuir la función de la mitocondria al inhibir la disponibilidad de **Pi** para la formación de **ATP**, y una menor concentración de ATP citoplasmático podría ejercer un efecto inhibitor de la apoptosis al tratarse de un proceso ATP-dependiente. Con el fin de eliminar esta posibilidad, se marcaron las células con **mitotracker**, un marcador sensible a la polarización que sólo es capaz de entrar en la mitocondria si la membrana interna está polarizada. Para llevar a cabo este experimento, se transfectaron células **HeLa** con los correspondientes **ARNis** y se trataron 48 h después con **STS** 1 μ M durante 3 h. 72 h post-transfección, las células se marcaron con **mitotracker**, y se sometieron a análisis por citometría de flujo. Mediante este ensayo, se comprobó que la depleción de **PiC** no presentaba un impacto detectable en la función mitocondrial, dado que la mitocondria mantenía su capacidad para incorporar **mitotracker** (**Figura 20**).

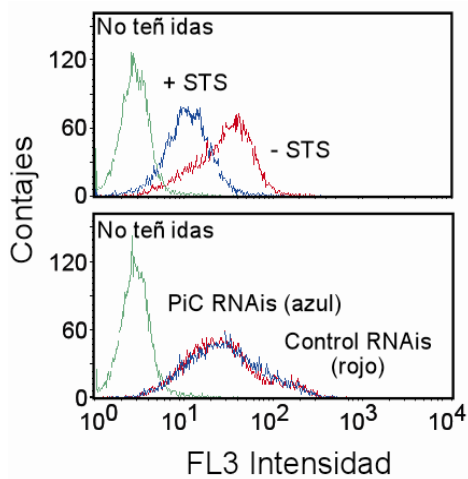


Figura 20. Polarización mitocondrial normal en células tratadas con los ARNis contra PiC.

Las células HeLa fueron transfectadas como en la **figura 18 a**, marcadas con mitotracker 72 h después de la transfección y analizadas por citometría de flujo (panel inferior). Como control, células no transfectadas se trataron con STS 1 μ M durante 6 h o se dejaron sin tratar (panel superior).

Por tanto, la disminución en la aparición de diferentes parámetros apoptóticos inducidos por **STS** en respuesta a la depleción de **PiC**, sugiere que este transportador participa en la vías apoptóticas mitocondriales inducidas por **STS**. Estos datos, junto con los resultados anteriores mostrando la unión de **PiC** a **ANT** y **VDAC** sugieren que esta participación se ejecuta a través de una contribución de **PiC** al **PTP**.

Discusión

Como ya se comentó en el apartado de **Introducción**, la reciente secuenciación del genoma humano ha resultado en la identificación de una gran cantidad de nuevos genes cuya función se desconoce. La anotación funcional de todas estas nuevas secuencias supone un trabajo masivo que no se puede abordar con técnicas convencionales, requiriendo, por tanto, del desarrollo e implementación de nuevas plataformas experimentales de alta capacidad que permitan el manejo y análisis simultáneo de un gran número de genes.

En este estudio se ha abordado la identificación a gran escala de moléculas que albergaran el potencial de inducir muerte celular al ser sobreexpresadas, sugiriendo que están funcionalmente vinculadas a las cascadas de señalización que regulan estos procesos de suicidio programado. Una característica común a la mayoría de células cancerígenas es su resistencia adquirida a sufrir apoptosis. Por tanto, la identificación de moléculas que puedan soslayar esta inmunidad de las células tumorales, bien induciendo apoptosis o bien otros tipos de muerte celular, proporcionaría un avance importante para el desarrollo de futuras terapias en el tratamiento contra el cáncer.

I. SCREENINGS FUNCIONALES DE ALTO RENDIMIENTO

Los *screenings* de alta capacidad que más se utilizan actualmente para abordar la anotación funcional de un gran número de moléculas se basan en el uso de **cultivos celulares**. Las células en cultivo presentan ventajas obvias en este contexto. Por ejemplo, resulta relativamente fácil introducir material genético en la mayoría de las células, y pueden ser cultivadas en condiciones definidas. Además, una gran variedad de fenómenos biológicos interesantes pueden ser revelados mediante el uso de **plásmidos reporteros** que facilitan la detección del fenómeno, y la cotransfección de estos reporteros junto con un exceso del ADN de interés permite la identificación de las células transfectadas en las que se debe esperar la aparición del fenotipo. Con frecuencia, sin embargo, fenómenos biológicos de interés pueden ser identificados de

un modo sencillo simplemente por las alteraciones morfológicas que inducen en las células. Este es el caso por ejemplo de la senescencia o la muerte celular programada.

1. Tipos de *screening* de alto rendimiento

1.1. *Screenings* dominantes por ganancia de función.

Son el tipo de *screening* más usado en células de mamífero y constituyen la base del **clonaje por expresión**. Se basan en la introducción de material genético (ADN o ARN) en las células para posteriormente poder identificar el clon que codifica la proteína de interés directamente a través su actividad biológica. Un ejemplo de una molécula clonada mediante este método ha sido la cardiotrofina 1, una citoquina que induce hipertrofia de los miocitos cardiacos (Pennica et al, 1995). Otro ejemplo bien conocido de genes que han sido identificados en *screenings* genéticos dominantes, son los oncogenes como por ejemplo el gen Hras (Bos, 1989) (Zarbl et al, 1985). La mayor atracción de los sistemas de clonaje por expresión es su potencial para revelar proteínas de secuencia desconocida basándose en la preidentificación de una actividad biológica, este es uno de los motivos que nos llevó a elegir este método de *screening* para identificar moléculas cuya sobreexpresión indujera procesos de muerte celular.

1.1.1. Transfección en cultivos celulares de mamífero

En la práctica, la introducción de plásmidos de expresión constituye un obstáculo en muchos tipos celulares, y muchos sistemas de clonaje de expresión continúan llevándose a cabo en un número relativamente pequeño de **líneas celulares**. Por este motivo, en algunos estudios se han empleado vectores retrovirales. Asimismo, se ha desarrollado métodos para permitir la replicación activa de ADN en el

hospedador. El sistema más comúnmente utilizado se basa en la introducción en las líneas celulares del antígeno T del virus SV40 para que pudieran posteriormente llevar a cabo la replicación de los plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación del virus. Otro método está basado en el origen de replicación del virus Epstein-Barr, en este caso la eficiencia de síntesis de ADN es menor pero se sigue empleando debido a su potencial aplicación sobre una amplia variedad de tipos celulares. Aunque las células humanas, por norma, son sólo parcialmente permisivas para la replicación del SV40, se han establecido muchas líneas celulares que han mostrado un título razonable de replicación de plásmidos exógenos con el origen de replicación del SV40 (de Chasseval & de Villartay, 1992) como son las líneas celulares de linfoma de Burkitt (Classon et al, 1987), neuroblastomas que expresan altos niveles del oncogen N-myc (Lee et al, 1991), la **línea celular HEK-293** de riñón humano embrionario (DuBridge et al, 1987) o la línea celular Jurkat, procedente de células T humanas (Clipstone & Crabtree, 1992).

1.1.2. Vectores de expresión

El empleo de **genotecas de ADNc clonadas en plásmidos** típicamente ofrece una mayor eficiencia de expresión y aislamiento que las genotecas de cósmicos o la transfección de ADN genómico (Brichard et al, 1993) (Kawakami et al, 1994) (Robbins et al, 1995).

1.2. Screenings recesivos por pérdida de función.

Se basan en la eliminación de la función de los genes y la posterior detección del fenotipo que origina este defecto. Algunos métodos para provocar la pérdida de la función de determinados genes es la disrupción génica mediante mutagénesis o el empleo de ARNi que reducen considerablemente la expresión de los genes diana e incluso a veces puede llegar a eliminarla completamente (Shuey et al, 2002) (Dykxhoorn et al, 2003) (Denli & Hannon, 2003). El empleo de ARNi para deplecionar

genes se testó en *C. elegans* (Fire et al, 1998) y se ha extendido a *Drosophila* (Zamore et al, 2000) y cultivos celulares de mamíferos (Lee et al, 2002) (Kawasaki & Taira, 2003) (Bridge et al, 2003) (Sledz et al, 2003). Un inconveniente de este tipo de *screening* por pérdida de función es que el fenotipo inducido sólo es observable si la pérdida de función del gen mutado no puede ser compensada. Aún así es un método ampliamente utilizado en la actualidad (Paddison et al, 2004) (Westbrook et al, 2005) (Silva et al, 2008).

1.3. Screenings letales sintéticos.

Detectan elementos genéticos o drogas que actúan de modo letal sólo en combinación con una mutación genética dada (Simons et al, 2001a). Es un potente método para desvelar interacciones funcionales entre proteínas. Este sistema de análisis parte de una línea celular deficiente en un gen de interés que se complementa con la presencia de un plásmido episomal que expresa dicho gen. Seguidamente se generan condiciones letales sintéticas por ejemplo: mediante el empleo de drogas que inhiben actividades enzimáticas particulares. La presión selectiva impuesta por cualquiera de los varios inhibidores metabólicos sintéticamente letales previene la pérdida espontánea del plásmido episomal que llega a ser esencial para la supervivencia de la célula. Las células se analizan buscando aquellas que retienen el plásmido de supervivencia. Estas células presentan el bloqueo de una actividad enzimática que es incompatible con la deficiencia del gen de interés, lo que indica una interacción funcional entre ellos.

Este sistema ha sido empleado para la identificación funcional de genes implicados en las rutas de síntesis de nucleótidos (Simons et al, 2001b). También se puede emplear para buscar ADNc, elementos genéticos con función dominante-negativa o ARNis que al introducirlos en estas células sean letales en combinación con el gen mutado. La aplicación de este tipo de *screening* permitiría la identificación de drogas que fueran sintéticamente letales al combinarse con un gen mutado específico, convirtiéndolo en un método especialmente atractivo para la búsqueda de drogas que maten células tumorales de un modo gen-específico basado en su genotipo celular predeterminado.

2. Ventajas e inconvenientes del método de análisis utilizado

Nuestro objetivo principal era analizar una genoteca que fuera representativa del genoma humano para identificar una extensa colección de genes implicados en procesos de muerte celular. Además, como ya se ha mencionado en otros apartados, una propiedad que comparten la mayoría de mediadores de transducción de señales, como en el caso de moléculas que participan en vías apoptótica o en otras modalidades de muerte celular programada, es que estas moléculas son capaces de activar la cascada de señalización que hay por debajo de ellos, es decir, inducen muerte celular al ser sobreexpresadas en células susceptibles. Aprovechando esta propiedad y teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo se eligió un método de *screening* por ganancia de función basado en el **sistema de clonaje por expresión** para identificar genes inductores de muerte celular a partir de una genoteca de ADNc.

En este trabajo se describe el análisis de alrededor de **135000 clones** de una genoteca de ADNc humana. El *screening* resultó en la identificación de **92 clones** capaces de inducir tres clases diferentes de muerte celular distinguibles morfológicamente, sólo una de las cuales es claramente muerte apoptótica. El método de detección se basó en la sobreexpresión del ADNc junto con GFP en células HEK-293T. La **GFP** permitió la detección de las alteraciones morfológicas producidas en las células. A través de este sistema de detección se identificaron clones capaces de inducir no sólo alteraciones morfológicas típicas de los procesos apoptóticos sino también otros fenotipos que han sido denominados “vacuolado” o “globular”, y que en algunas ocasiones se han asociado a procesos de muerte celular programada no apoptóticos.

- **Genoteca de partida:** uno de los inconvenientes de emplear una genoteca de **ADNc** generada a partir de **linfocitos T** es que, al tratarse de células diferenciadas, presentan un patrón de transcripción génica estable, en el cual, además de un grupo de genes universales como el citocromo *c* o la β -actina, se expresa un grupo de genes específicos del tipo celular, y una gran parte del genoma permanece permanentemente silenciado (Kiss-Toth et al, 2004).

Además, dado el tamaño y la enorme complejidad del genoma humano, posiblemente no todos los genes estén representados. Por estos motivos, sería de gran utilidad el empleo de genotecas más universales y normalizadas que expresaran la gran mayoría de genes y lo hicieran a niveles equivalentes. Asimismo, dado que muchas de las moléculas identificadas en este trabajo se clonaron como formas **truncadas**, sería de gran utilidad el empleo de genotecas de ADNc de secuencia completa, como la utilizada por Matsuda en 2003 en un *screening* similar al nuestro (Matsuda et al, 2003). De este modo, disminuiría la posibilidad de clonar versiones truncadas inductoras de unas alteraciones celulares concretas, pero que en su forma completa no provocaran este fenotipo. Además, estas genotecas no requieren un esfuerzo adicional para aislar **ADNc** completos y, como su extremo 5' debería corresponder exactamente con el sitio de inicio del ARNm, las secuencias promotoras adyacentes darían importantes pistas acerca de la regulación transcripcional de los genes. Sin embargo, el empleo de una genoteca con formas de ADNc truncadas, nos ha permitido identificar en numerosas ocasiones varias moléculas implicadas en la formación del citoesqueleto, todas ellas clonadas como formas truncadas, que inducían procesos de muerte celular. Este resultado sugiere que estas moléculas truncadas podrían estar interfiriendo con las proteínas endógenas a modo de dominantes negativos, revelando un papel esencial de las proteínas diana para la viabilidad celular.

- **Células diana:** es un fenómeno conocido que una misma citoquina puede promover mitosis o apoptosis dependiendo del tipo de célula diana. De este modo, una misma molécula de señalización puede tener una **respuesta celular opuesta** dependiendo del tipo celular en el que se expresen, por ejemplo: en células neuronales, p38 ejerce una función proapoptótica (Xia et al, 1995) mientras que en fibroblastos tratados con TNF es antiapoptótico (Roulston et al, 1998).
- **ADNc:** los sistemas de clonaje por expresión no son apropiados cuando se quieren clonar ADNc inusualmente largos o cuando la proteína diana es un

heteromultímero que requiere cada uno de sus componentes individuales para que su actividad se exprese.

- **Clonaje por sobreexpresión:** la introducción y sobreexpresión de ADN exógeno en la célula podría causar un desequilibrio entre los componentes de la ruta de señalización y provocar la activación artificial de dicha vía por un gen que en realidad no es un componente de la misma. Esto implicaría que algunos de los ADNc identificados podrían ser **artefactos** de la sobreexpresión. Se requerirían análisis bioquímicos de cada uno de los genes identificados para concluir que realmente son activadores de la ruta de señalización (Matsuda et al, 2003). En cambio, en el caso de los transportadores mitocondriales clonados, se podría afirmar que sí participan en las vías apoptóticas, puesto que su sobreexpresión fue comparada con la de un miembro de la familia de transportadores inactivo para la inducción de apoptosis, el **ANT2**. De este modo, se demostró que la sobreexpresión de los transportadores clonados inducía muerte celular a diferencia de **ANT2**, y que por tanto, la apoptosis provocada por los transportadores no era un artefacto de la sobreexpresión (**Figura11 b**, pág 84). Por el contrario, también sería posible que se perdieran ADNcs que sí estuvieran implicados en las vías de señalización pero que no fueran activados por sobreexpresión (Matsuda et al, 2003).
- **Ventajas adicionales del método de análisis empleado:** Albayrak en 2003 ya realizó un *screening* para identificar moléculas proapoptóticas en base a dos alteraciones morfológicas: el *blebbing* de la membrana (Kerr et al, 1994) y la pérdida de volumen celular (Bortner & Cidlowski, 1998) (Albayrak & Grimm, 2003). Una de las ventajas del método de *screening* desarrollado en este estudio frente al empleado por Albayrak, es el empleo de **sistemas robóticos** para organizar los clones de la genoteca en grupos y su posterior transfección. De este modo, se logró analizar un gran número de clones simultáneamente. Además, como ya se ha comentado, la cotransfección con **GFP** para la detección de alteraciones morfológicas inducidas en las células mediante microscopía, permitió la identificación no sólo de clones capaces de

inducir apoptosis sino también otros procesos de muerte celular no apoptóticos, como la autofagia o la paraptosis, que cursan con alteraciones morfológicas cualitativamente diferentes de las apoptóticas.

2.1. Aplicaciones

Los sistemas de clonaje por expresión, además de constituir una potente herramienta para la identificación de genes en base a su función, puede ser aplicable para esencialmente todas las vías de señalización. Asimismo, los genes aislados mediante este sistema se pueden emplear en diversas aplicaciones:

En primer lugar, los genes son herramientas más potentes que las drogas para el tratamiento de las enfermedades, debido a su mayor especificidad y eficiencia. Podrían emplearse directamente como agentes terapéuticos, además, las proteínas intracelulares podría usarse como herramientas farmacológicas altamente eficaces. Las proteínas también se podrían emplear para definir el sensor específico para la inducción de apoptosis, por ejemplo, aislando proteínas de interacción.

A pesar de las limitaciones mencionadas, el sistema de análisis empleado en este trabajo ha identificado varios mediadores apoptóticos conocidos, validando así su capacidad para clonar reguladores relevantes de los procesos de muerte celular. Además, ha permitido identificar una amplia colección de moléculas implicadas en diversas familias moleculares y funcionales que inducen distintos procesos de muerte celular programada, que si bien no todas ellas tiene realmente un papel fisiológico en estas rutas, se ha demostrado que al menos, en el caso del PiC, sí poseen una papel relevante en apoptosis, abriendo así la posibilidad de estudiar una amplia gama de moléculas que permitan comprender mejor los programas de muerte celular.

II. CONTROVERSIA RESPECTO A LA COMPOSICIÓN DEL PTP

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la actividad proapoptótica derivada de la sobreexpresión de **PiC** refleja una función fisiológica de esta molécula en las vías de señalización apoptótica. El trabajo realizado revela un papel de este transportador en la regulación activa de la liberación de citocromo *c* de la mitocondria durante la apoptosis, que no había sido descrito previamente, probablemente ejecutado a través de una intervención directa en el **PTP**. Este resultado se ve apoyado por publicaciones recientes en las que diversos autores apuntan a una mayor flexibilidad en la composición de **PTP**, y a la posible participación en el poro de otros transportadores mitocondriales en ausencia de **ANT**.

1. El PTP y su composición

Aunque existe una gran controversia respecto a la universalidad del fenómeno de transición de permeabilidad mitocondrial (**MPT**) como principal mecanismo para la liberación de **citocromo c** durante la apoptosis (Garrido et al, 2006), abundantes evidencias farmacológicas apoyan esta idea (Zamzami & Kroemer, 2001). Históricamente se ha pensado que el poro que media **MPT**, el denominado **PTP**, está mínimamente constituido por **ANT**, **VDAC** y **ciclofilina D** (Zamzami & Kroemer, 2001) (Crompton et al, 2002). Sin embargo, algunos resultados más recientes apuntan a una **estructura más flexible** de este poro (Zoratti et al, 2005). Por ejemplo, los datos que relacionan el **PTP** y la apoptosis están fuertemente basados en **drogas** que actúan sobre **ANT**, sugiriendo un papel central de este transportador (Zamzami & Kroemer, 2001). Sin embargo, la respectiva contribución de **ANT** y también de **VDAC** al **PTP** ha sido recientemente cuestionada en diversos estudios en los que ratones carentes de estas proteínas retenían la capacidad de sufrir mPT ((Kokoszka et al, 2004), (Baines et al, 2007)) indicando que un **PTP** funcional podría ensamblarse en **ausencia de ambas moléculas** (Kokoszka et al, 2004) (Baines et al, 2007) y

apuntado a la existencia de **poros no canónicos** (Halestrap, 2004) (Zoratti et al, 2005). Otros datos adicionales que son compatibles con esta idea como es el hecho de que el **PTP** muestra **múltiples estados de conductancia**, sugiriendo la implicación de diferentes unidades funcionales (Zoratti et al, 2005) (Brenner & Grimm, 2006). Asimismo, **ANT1** se puede **purificar** como parte de **múltiples subcomplejos** mitocondriales cuyo estado de composición y oligomerización depende del contexto metabólico (Ko et al, 2003) (Faustin et al, 2004) (Brenner & Grimm, 2006). Además, el patrón de proteínas que interaccionan con **ANT** cambia a lo largo del tiempo durante la apoptosis inducida por quimioterapia (Verrier et al, 2004). Por tanto, **ANT** parece establecer contactos flexibles modulados tanto por el estado metabólico como por la presión apoptótica, dificultando la identificación de un poro con una única composición molecular (Zoratti et al, 2005) (Brenner & Grimm, 2006).

1.1. Evidencias de que **VDAC** no es esencial para el **PTP**

Aunque varias evidencias apoyan la participación de **VDAC** en el **PTP** (ver Introducción), recientes estudios con mitocondrias de ratones nulos para las isoformas **VDAC1** y **VDAC3** muestran una inducción normal de **MPT** en respuesta a Ca^{2+} y estrés oxidativo, indistinguible a las mitocondrias salvajes y que además sigue siendo inhibible por **CsA** (Baines et al, 2007). No obstante, la delección de la isoforma **VDAC2** en ratones no se ha podido testar puesto que resulta en letalidad embrionaria, por lo que la delección de **VDAC1** y **VDAC3** puede estar compensada por **VDAC2**. Sin embargo, **VDAC2** ha demostrado actuar como un agente citoprotector secuestrando e inactivando a la proteína proapoptótica **Bak** (Cheng et al, 2003), y por tanto no se puede asegurar que esta isoforma participe en la inducción del **MPT**. Además, se ha visto que fibroblastos embrionarios murinos (**MEFs**) nulos para **VDAC2**, mostraban un incremento de la muerte celular en respuesta a estrés oxidativo (Baines et al, 2007), sugiriendo de nuevo que **VDAC2** no funciona como un regulador pro-muerte a través de **MPT**. Los efectos de la eliminación de las tres isoformas de **VDAC** se testaron generando **MEFs** deficientes en las tres proteínas (Baines et al, 2007). Estos estudios demostraron que la carencia en las tres isoformas de **VDAC** no evita la inducción del **PTP**, cuestionando el papel esencial de **VDAC** en

el funcionamiento del **PTP** y sugiriendo la existencia de proteínas alternativas que puedan estar jugando un papel en muerte celular mitocondrial a través del **PTP** en ausencia de **VDAC** (Baines et al, 2007).

1.2. PTP en ausencia de CypD

La implicación de **CypD** en el **PTP** se ha deducido de la capacidad para inhibir la actividad del poro que tiene la **CsA**, un inhibidor específico de las ciclofilinas (Broekemeier et al, 1989). Experimentos con ratones deficientes en **CypD** han demostrado que las mitocondrias carentes de esta proteína llevan a cabo **MPT** insensible a **CsA** (Nakagawa et al, 2005). Además, la carencia de **CypD** disminuye la sensibilidad del **PTP** al Ca^{2+} , por lo que se requieren altas concentraciones de Ca^{2+} para inducir su apertura. Asimismo, la respuesta de mitocondrias deficientes en **CypD** a agentes como la ubiquinona u oxidantes tiol que provocan **MPT** insensible a **CsA**, es igual a la inducida en mitocondrias salvajes (Basso et al, 2005). Todos estos datos parecen indicar que la **CypD** está implicada específicamente en el **MPT** sensible a **CsA**, sugiriendo que la función de la **CypD** no es completamente esencial para el **PTP**, como ya propuso Halestrap en 2003 (Halestrap & Brennerb, 2003), sino que más bien se trata de un papel regulador como receptor mitocondrial de la inhibición por **CsA**.

En contraste con estos resultados, estudios realizados en diversos laboratorios parecen indicar que el **MPT** dependiente de **CypD** juega un papel importante en algunas formas de muerte celular por **necrosis**, pero no apoptosis (Tsujiimoto & Shimizu, 2007). Por ejemplo, se ha visto que MEFs deficientes en **CypD** son significativamente más resistentes a la necrosis inducida por H_2O_2 (Nakagawa 2005) (Baines, 2005), y que los hepatocitos deficientes en **CypD** presentan resistencia a la necrosis inducida por exceso de Ca^{2+} o H_2O_2 (Nakagawa et al, 2005) (Baines et al, 2005). Sin embargo, cuando la necrosis es inhibida por la deficiencia de **CypD** en estas células, la apoptosis no ocurre como un mecanismo de muerte alternativo (Nakagawa et al, 2005), sugiriendo que estas células de algún modo bloquean la ruta de señalización apoptótica activada por el exceso de Ca^{2+} o estrés oxidativo.

Dado que la apertura del **PTP** se ha observado tanto en apoptosis como en necrosis, diversos autores proponen que la intensidad del daño, la duración de la apertura del **PTP** y el nivel de **ATP**, podría determinar el modo de muerte celular: apoptosis frente a necrosis.

1.3. Evidencias de que **ANT** no es esencial para el **PTP**

Como ya se ha comentado, la participación de **ANT** en el **PTP** se fundamentaba principalmente en la fuerte modulación que sufre el poro por ligandos de **ANT** como **atractilato o atractilósido (Atr)**, que favorecen su apertura, o el ácido bongocrécico (**BA**) y los **nucleótidos adenina** que actúan inhibiéndolo (Haworth & Hunter, 1980) (Haworth & Hunter, 2000). Sin embargo, en recientes experimentos, se ha visto que las mitocondria de hígado de **ratones knockout** para las dos isoformas que se conocían, **ANT1** y **ANT2**, aún son capaces de sufrir **MPT** dependiente de **Ca²⁺** y sensible a **CsA**. La única diferencia con mitocondrias salvajes, es que las nulas para **ANT** requieren mayores cantidades de **Ca²⁺** para inducir **PTP**, y presentan insensibilidad a los ligandos de **ANT** (Kokoszka et al, 2004). Este experimento sugirió que **ANT** podría ser dispensable para el **PTP** y la apoptosis inducida por diversos estímulos, pero no para sus propios ligandos como **Atr** o los **nucleótidos adenina** (Kokoszka et al, 2004). Por tanto, **ANT** no sería esencial para el **PTP** pero sí contribuiría a su regulación. Estos resultados contradicen las evidencias previas que asignan un papel esencial al **ANT** en el **PTP** y ponen en duda el modelo anteriormente aceptado para dicho poro (Halestrap & Brennerb, 2003) (Halestrap et al, 2000). Recientemente, sin embargo, se ha descubierto una **nueva isoforma de ANT** tanto en humanos como en ratones, el **ANT4**, (que se localiza en el hígado, testículos y cerebro (Dolce et al, 2005)). Esta isoforma es sensible tanto a **Atr** como al **BA**, por lo que podría estar supliendo la carencia de las otras isoformas.

Por tanto, estos experimentos en *knockouts* sugieren que **ANT** sólo juega un papel limitado en el **MPT**, pudiendo ser compensada su deficiencia bajo condiciones específicas por otros canales similares de la membrana mitocondrial interna, dado

que el **MPT** va acompañado de pérdida del $\Delta\psi$. Además, los miembros de la familia de transportadores mitocondriales se caracterizan por presentar una estructura muy conservada (Palmieri, 2004), reforzando la posibilidad de que en ausencia de **ANT**, otros miembros menos abundantes de la familia puedan estar compensando su deficiencia (Halestrap & Brennerb, 2003) (Dierks et al, 1990) (Brustovetsky et al, 2002). Estos otros transportadores también formarían canales en la membrana mitocondrial interna, pero con una menor sensibilidad al Ca^{2+} e insensibilidad a los ligandos del **ANT** (Halestrap, 2004) (Palmieri, 2004), aunque serían sensibles a **CsA** (Rasola & Bernardi, 2007) (Brenner & Grimm, 2006). En este contexto, la identificación de canales alternativos en la membrana mitocondrial interna, formados por otros miembros de la familia de transportadores mitocondriales que estén directamente implicados directamente en el **PTP** sería de gran relevancia. De este modo, la contribución de formas del **PTP** con o sin **ANT** dependería de las condiciones específicas (Halestrap, 2004) y la prevalencia de **ANT** en el **PTP** podría ser debida, al menos en parte, a la abundancia de esta proteína en la membrana mitocondrial interna.

2. Evidencias que apoyan la participación de **PiC** en el **PTP**

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan un papel regulador en las vías apoptóticas de uno de los miembros de la familia de transportadores mitocondriales, el **PiC**, participación que se ve apoyada por una variedad de evidencias. En primer lugar, **PiC**, al igual que **ANT**, parece presentar una doble función. Por un lado, este transportador está implicado en regulación metabólica, y por el otro muestra un papel en las vías apoptóticas. De este modo, **PiC** establece contactos débiles con **ANT** y la **ATP sintasa** para formar el **ATP sintasoma**, un complejo proteico que presumiblemente facilita el uso del sustrato (ADP) durante la generación metabólica de **ATP** (Ko et al, 2003). Por otro lado, los resultados mostrados indican que la interacción entre **PiC** y **ANT1** se estabiliza bajo presión apoptótica, al tratar las células con el inductor apoptótico **STS**, sugiriendo una transición inducida sobre el **PiC** a su “modo de muerte” que podría reflejar una participación en el **PTP**. Más allá

de estos resultados, existen otras evidencias consistentes con esta implicación de **PiC** en el **PTP**. Un ejemplo de ello es el hecho de que el poro muestra dependencia al **Pi** en algunos sistemas (Zoratti et al, 2005), sugiriendo la presencia de una subunidad sensible al **Pi**. Además, se ha demostrado que el **PiC**, al igual que otros transportadores mitocondriales, puede formar canales en membranas lipídicas (Zoratti et al, 2005), y se ha demostrado en este trabajo que posee la capacidad de interactuar con **VDAC1**, además de **ANT**.

En conclusión, aunque se precisarían más estudios para demostrar formalmente que el **PiC** puede contribuir al **PTP** y **MPT**, todos estos datos argumentan que ésta es una noción plausible. De hecho, ya se propuso anteriormente un posible papel de **PiC** en la formación de un poro no canónico que explicara como ocurre el **MPT** en ausencia de **ANT** (Halestrap, 2004) (Zoratti et al, 2005). Asimismo, recientemente se ha descrito otra función del **PiC** que apoya su implicación en apoptosis, al demostrarse que actúa como diana de la proteína antiapoptótica **vMIA** (Poncet et al, 2006). Ésta es una proteína viral localizada en la mitocondria que actúa como inhibidor apoptótico y es imprescindible para la replicación del citomegalovirus humano (**CMV**). **vMIA** recluta a **Bax** en la mitocondria neutralizando su actividad. Estos autores vieron que la expresión de **vMIA** coincidía con una reducción en el nivel de **ATP** debido a la inhibición selectiva de uno de los componentes del ATP sintasoma, el **PiC** (Poncet et al, 2006).

Como ya se ha comentado, las mitocondrias carentes de **ANT** requieren altos niveles de calcio para inducir cambios de permeabilidad (Kokoszka et al, 2004). Por tanto, aunque no es esencial, **ANT** probablemente regula del algún modo **MPT** y la salida de **citocromo c**. De hecho, los datos obtenidos en este trabajo mediante estudios con ARNi refuerzan la noción de un papel regulador de **ANT**, al demostrar que la reducción en sus niveles de expresión disminuye significativamente el número de células que muestran movilización de **citocromo c** en respuesta a **STS** (ver **Figura 18 a**, pág 98). Del mismo modo, estos resultados también muestran un papel parcial de **PiC** en la salida de **citocromo c** (**Figura 18 a**, pág 98). Asimismo, el hecho de que diversas **drogas** que inhiben componentes particulares del **PTP** proporcionen frecuentemente una **protección incompleta** frente a la muerte celular (Zoratti et al,

2005) (Brenner & Grimm, 2006), apoya de nuevo un papel parcial de los transportadores en la liberación de **citocromo c**. Estas contribuciones recurrentemente parciales al **PTP** podrían explicarse por la implicación de diferentes entidades en el poro que cooperan simultáneamente para inducir **MPT**. Esta visión podría ayudar a entender porque en nuestro *screening* se han identificado también otros transportadores mitocondriales. De este modo, tanto la **actividad proapoptótica de ANT3, MTCH1 y MTCH2**, como su variable capacidad para interactuar con los componentes del **PTP** (**Figura 16**, pág 92) podrían simplemente reflejar un potencial para construir diferentes poros funcionales, capaces todos ellos de inducir mPT y liberación de citocromo c. Obviamente, se precisan más estudios para defender esta idea, pero algunas publicaciones previas ya habían adscrito a algunos de estos transportadores una función relacionada con las vías apoptóticas.

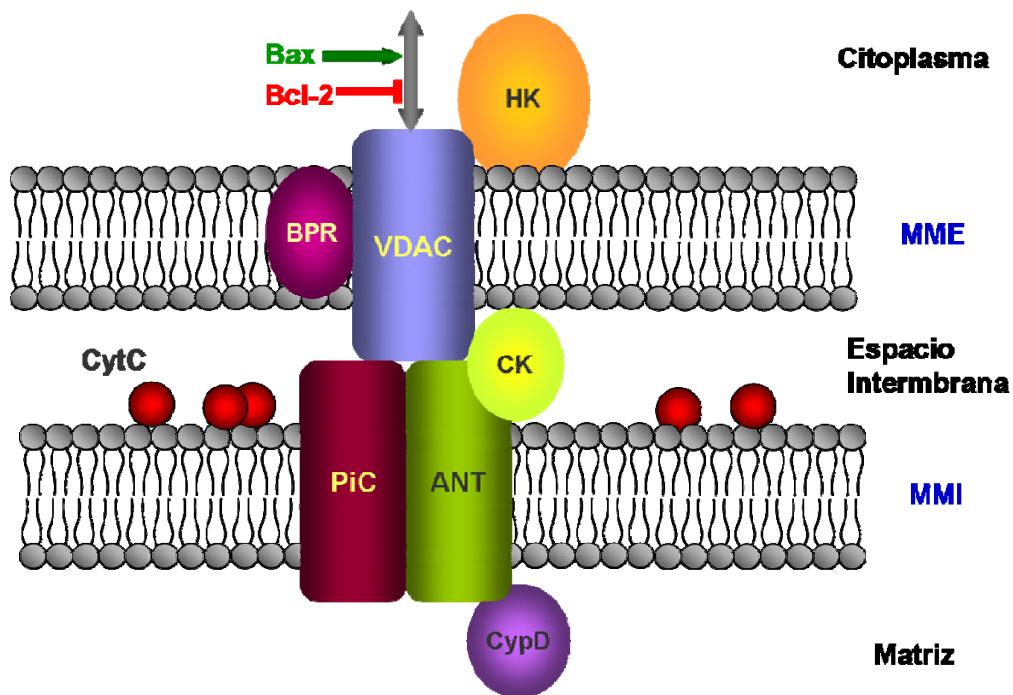


Figura 1. Posible modelo de participación de PiC en el PTP. PiC interaccionaría con ANT y VDAC para inducir la apertura del poro en presencia de estaurosporina.

3. Implicación de los transportadores clonados en apoptosis

3.1. Implicación de MTCH1 en apoptosis

Como ya se ha comentado, **MTCH1** fue inicialmente identificado como una proteína asociada a presenilina que se denominó **PSAP** cuya sobreexpresión provocaba muerte celular por apoptosis y liberación de citocromo c independiente de caspasas. Tanto esta actividad proapoptótica de **PSAP** como su localización mitocondrial sugería que **MTCH1** podía tener un papel importante como regulador de la apoptosis (Xu et al, 2002). Además, un estudio reciente ha desvelado que la sobreexpresión de **MTCH1 (PSAP)** en MEFs carentes de **Bax** y **Bak**, provoca despolarización mitocondrial y apoptosis independiente de ambas moléculas proapoptóticas (Lamarca et al, 2008). Todos estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por **PSAP/MTCH1** implica una probable participación en el **PTP**, aunque nuestros resultados sugieren que no sería a través de una interacción con los miembros clásicos del poro.

3.2. Papel apoptótico de MTCH2

MTCH2 fue aislado en un complejo mitocondrial junto con las moléculas proapoptóticas **tBid** y **Bax**. **TNF- α** promueve el reclutamiento de **tBid** y **Bax** a este complejo, agregación que es parcialmente inhibida por **Bcl-X_L**. Estos resultados apuntan a que **MTCH2** podría ser una diana mitocondrial de **tBid** y sugieren la posibilidad de que el complejo en el que reside **MTCH2** intervenga en la apoptosis mitocondrial (Gross, 2005) (Grinberg et al, 2005).

3.3. Papel de ANT3 en apoptosis

Estudios previos comprobaron que la sobreexpresión de **ANT3**, al igual que **ANT1**, induce apoptosis inhibible por los inhibidores del PTP **BA** y **CsA**, indicando que ambas proteínas actúan a través del mismo mecanismo (Zamora et al, 2004). Asimismo, la ausencia de apoptosis inducida por la sobreexpresión de **ANT2**, a pesar de su homología de secuencia con **ANT1** y **ANT3**, demuestra que la apoptosis inducida por estas dos isoformas no es un artefacto de la sobreexpresión (Zamora et al, 2004).

En conclusión, a través de un programa de alto rendimiento para identificar moléculas capaces de inducir muerte celular hemos podido extender a otros miembros de la familia de transportadores mitocondriales una función apoptótica que se creía restringida a representantes específicos de este grupo. Nuestros datos sugieren que una propiedad común de los transportadores mitocondriales fue explotada durante la evolución para regular apoptosis y, además, ayuda a solidificar la idea de que la mitocondria es el orgánulo central en el control de la muerte apoptótica. Finalmente, este protocolo de *screening* ha producido una amplia colección de moléculas capaces de inducir tanto apoptosis como otros procesos de muerte celular atípicos, abriendo la posibilidad de realizar análisis detallados de cada uno de estos clones que ayudarían a obtener un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan los diferentes procesos de muerte.

Por último, podemos concluir que a pesar de las discrepancias respecto a la composición molecular del **PTP**, este poro juega un importante papel en muerte celular y, por tanto, representa una diana importante para el desarrollo de nuevas terapias. El mayor interés en la investigación para el desarrollo de terapias contra el cáncer consiste en encontrar componentes específicos de las células transformadas. ¿Podría el **PTP** ser una diana para este objetivo al presentar diferentes composiciones?

Conclusiones

1. El protocolo de *screening* ha producido una amplia colección de moléculas capaces de inducir tanto apoptosis como otras modalidades de muerte celular atípica:
 - La sobreexpresión de uno de los clones inductores del fenotipo denominado globular, MYM6, provoca muerte celular por autofagia.
 - Se ha diferenciado 2 procesos diferentes de vacuolización.
2. Se clonaron cuatro transportadores mitocondriales cuya sobreexpresión inducía alteraciones morfológicas y moleculares típicas de los procesos apoptóticos.
3. La apoptosis inducida por los transportadores es dependiente de caspasas y está mediada por la vía mitocondrial.
4. PiC interacciona tanto con ANT1 como con VDAC1, sugiriendo su participación en el poro de transición de permeabilidad.
5. PiC incrementa su asociación con ANT1 en presencia del inductor apoptótico STS, y la depleción del transportador disminuye los parámetros apoptóticos analizados, demostrando su relevancia funcional en este contexto.

Materiales y Métodos

1. Líneas celulares

Hela, procedentes de carcinoma epitelial de cérvix humano.

HCT116, obtenidas a partir de un carcinoma de colon humano.

HEK-293T, provienen de riñón humano embrionario (*human embryonic kidney*, HEK-293). Estas células han sido transformadas con los genes adenovirales E1a y E1b, además de contener inserto el antígeno T del virus SV40 (virus de simio 40), por lo que poseen una elevada capacidad proliferativa (Graham et al, 1977).

Los sobrenadantes de virus para las transducciones retrovirales, se obtuvieron a partir de una variante de las células HEK-293T generada en nuestro laboratorio que expresaba diferentes inhibidores de apoptosis:

1.1. Generación de células HEK-293 estables resistentes a apoptosis

Se transfectaron células HEK-293T mediante el método de precipitación por fosfato cálcico con un plásmido que expresa simultáneamente **p35** y el gen de resistencia a puromicina; y otro que coexpresaba **Bcl-X_L**, **CrmA** y el gen de resistencia a higromicina. **CrmA** y **p35** son inhibidores virales de caspasas, producidos por cowpox virus y baculovirus respectivamente (Villa et al, 1997). **Bcl-X_L** es una proteína de la familia Bcl-2 que también actúa como inhibidor apoptótico regulando la permeabilidad mitocondrial (Green & Reed, 1998).

24 h después de la transfección, las células se sometieron al medio de selección DMEM con 200 µg/ml de higromicina, 0,5 µg/ml de puromicina y 0,5 mg/ml de neomicina (para seleccionar el antígeno T). Varios días más tarde, se plaquearon 10, 50 y 100 células en placas de 10 cm para diluirlas y así poder picar las colonias aisladas, aproximadamente 20 días después, con los clones resistentes que habían adquirido ambos plásmidos.

1.2. Mantenimiento celular

Todas las líneas celulares provienen de la colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection, ATCC*) y fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) con el sistema del complemento inactivado por calor a 56 °C durante 40 min, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera humidificada y 5 % de CO₂.

2. Reactivos

zVAD.fmk (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Es un inhibidor químico general de las caspasas. Se utilizó para inhibir la muerte de las células transfectadas con moléculas proapoptóticas, lo que impediría visualizar al microscopio las estructuras celulares en los experimentos de inmunofluorescencia. Se diluyó en DMSO y se empleó a una concentración final de 50 µM.

Estaurosporina (STS) (Sigma, St Louis, MO, USA). Se utilizó para inducir apoptosis diluida en DMSO y se trataron las células a una concentración final de 1 µM.

Ioduro de propidio (IP) (Sigma, St Louis, MO, USA). Usado para evaluar muerte celular a una concentración final de 1 µg/ml.

Mitotracker (Molecular Probes, Invitrogen). Se empleó para medir la polarización mitocondrial a una concentración final de 100 nM.

3. Sistema de análisis de la genoteca de ADN complementario (ADNc)

Se partió de una librería de ADNc obtenida a partir de células T humanas y clonada en el vector de expresión pEAK (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA). Dicha librería fue sembrada en placas de 22 x 22 cm con LB-Agar al 2 %, 50 µg/ml de ampicilina (Calbiochem), 10 µg/ml de cicloheximida (Sigma) y 5 µl de Antifoam (Sigma) para evitar la formación de espuma.

Las colonias bacterianas obtenidas se inocularon en placas de 384 pocillos con 80 µl de medio TB (*Terrific-Broth*) (1,2 % triptona, 2,4 % extracto de levadura) suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, 10 µg/ml de cicloheximida y glicerol al 7,5 % para protegerlas de la congelación. Estas placas de 384 pocillos se mantuvieron a -70 °C hasta el momento de su utilización. Se agruparon cada uno de los 96 clones que se generan al dividir la placa original en 4 sectores, en un nuevo pocillo de un bloque de 96 pocillos con 1,5 ml de TB por punto, 50 µg/ml de ampicilina y 10 µg/ml de cicloheximida usando el robot picador QpixII (Genetix, Hampshire, UK). De este modo, se obtuvo un volumen suficiente de cultivo para poder extraer el ADN plasmídico utilizando el Biorobot-3000 de Qiagen. Este ADN, se cotransfectó junto con un plásmido que expresaba la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) en células HEK-293T mediante el método de precipitación con fosfato cálcico, descrito en el apartado de transfecciones. 36h después, las células transfectadas se analizaron *in vivo* utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 135; Carl Zeiss MicroImaging, Inc). Para aislar el clon responsable del fenotipo dentro del grupo de 96 clones que se había detectado como positivo, se descongeló la placa original de 384 pocillos y, el cuadrante a partir del cual se había obtenido el grupo de 96 clones, se reagrupó por filas y columnas. El nuevo ADN plasmídico extraído de estos subgrupos se transfectó en células HEK-293T. De este modo, en la intersección entre las filas y columnas positivas se localizaban los genes de interés.

4. Construcciones de ADN

Los ADNc de los transportadores mitocondriales clonados fueron marcados con el péptido **AU1** (DTYRYI) en el extremo N-terminal, a excepción del transportador de fosfato (*phosphate carrier*, **PiC**) que se marcó en su extremo C-terminal. El marcaje de **PiC** en el extremo N-terminal, impedía la detección de la molécula, posiblemente debido a que, para dirigir el transportador a la mitocondria, su extremo N-terminal era procesado.

La versión truncada obtenida del **MTCH1** fue completada mediante PCR por amplificación de su extremo 5' a partir de una librería de ADNc.

Los ADNcs de **VDAC1**, **NIP** y **ANT2** fueron clonados en el *screening* de la genoteca de ADNc.

La proteína **LC3A** humana (NM_032514) y el ADNc de **ANT1** (NM_001151) fueron amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) a partir de una librería de ADNc.

Todos los ADNc se secuenciaron y clonaron en el vector de expresión pEAK (Edge Biosystems) utilizando las dianas de restricción Hind III y Not I.

ANT1 y **VDAC1** se marcaron con el epítipo **HA** (hemaglutinina del virus de la gripe, YPYDVPDYA) para los experimentos de inmunoprecipitación.

En los experimentos de autofagia, se utilizaron versiones de **LC3A** marcadas con **HA** o con **GFP**.

Debido a que la sobreexpresión de **Bcl-X_L** inducía muerte basal, se utilizó una construcción AU-Bcl-X_L insertada en un vector con el sitio de replicación del antígeno T del SV40 inactivado, de modo que el antígeno T de las células HEK-293T no era capaz de reconocerlo y la replicación era menor; aún así, se obtenía un nivel de expresión suficientemente alto. Los plásmidos de expresión que contienen la versión mutada de la caspasa-9 con capacidad dominante-negativa (**C9.DN**) y **p35** (Rabizadeh et al, 2004) fueron cedidos por el Dr. Rabizadeh (The Buck Institute for Age Research, Novato, CA).

La proteína fluorescente verde mitocondrial (**mGFP**, *mitochondrial green fluorescent protein*) se construyó fusionando, en el extremo N-terminal de la GFP, la

secuencia de localización mitocondrial de la ornitina transcarbamilasa, donada por la Dra. Ute Moll (Stony Brook University, Stony Brook, New York).

La RFP dirigida al retículo endoplasmático (**reRFP**) fue creada por PCR introduciendo en su extremo C-terminal la secuencia de aminoácidos SEKDEL, capaz de conferir a proteínas heterólogas la capacidad de retención en el retículo (Munro & Pelham, 1987). Este fragmento fue ligado a la secuencia líder de la molécula de superficie CD5, y clonado dentro del vector pEAK.

5. Transfecciones y transducciones retrovirales

5.1. Transfecciones transitorias

Las células se sembraron en placas de 6, 24 o 96 pocillos y placas de 10 cm. Entre 1 y 4 horas antes de la transfección en placas de 6 pocillos o de 10 cm, se procedió a cambiar el medio para inducir un aumento en la tasa de crecimiento celular de modo que se obtuvieran unas condiciones óptimas para la transfección. Para las células HEK-293T, se empleó el método de precipitación con fosfato cálcico, mientras que en HeLa y HCT116 las transfecciones se realizaron mediante los sistemas lipídicos Fugene (Roche, Mannheim, Alemania) o jetPEI (Polyplus, Illkirch, Francia) respectivamente. Las células se transfectaron con vector vacío, como control negativo, o con el ADN de interés; además de un plásmido que expresaba GFP como marcador de la transfección.

A continuación, se describen las distintas técnicas empleadas:

5.1.1. Método de transfección por precipitación con fosfato cálcico (Ausubel et al., 1987)

Este sistema fue descrito previamente por Van der Eb y Graham en 1980. Se sembraron 0,24; 1,35; 8,5 y 30 x 10⁵ células HEK-293T en placas de 96, 24 y 6 pocillos, y en placas de 10 cm de diámetro respectivamente. 24 h después, y una vez

que las células llegaron aproximadamente a un 70-80 % de confluencia, fueron tratadas con las cantidades de reactivo que se describen a continuación para placas de 6 pocillos (en el resto de los formatos, se emplearon cantidades proporcionales al tamaño del pocillo): 112,5 µl H₂O; 12,5 µl CaCl₂ (2,5 M); 5 µg del plásmido con el ADN correspondiente y 125 µl HEBS 2X a un pH de 7,05 (140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄-2H₂O y 50 mM HEPES en agua).

5.1.2. Método de transfección con FuGENE 6

Se utilizó en las células HeLa debido a su dificultad para ser transfectadas mediante precipitación con fosfato cálcico. Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron $0,3 \times 10^5$ células HeLa por pocillo en placas de 24 pocillos y $1,1 \times 10^6$ células en placas de 10 cm con medio DMEM (sin suero ni antibióticos añadidos). 24 h después, se procedió a su transfección. Por cada punto de las placas de 24 pocillos, se preparó una mezcla con 0,6 µg del plásmido con el ADN correspondiente y 4 µl de tampón TE. En el caso de las placas de 10 cm, se emplearon 12 µg de ADN y 120 µl de TE. Por otro lado, se mezclaron 40 µl de medio DMEM (no suplementado con suero, ni antibióticos) con 1,8 µl de FuGENE por cada punto de la placa de 24 pocillos. En el caso de placas de 10 cm, se utilizaron 1164 µl de DMEM y 36 µl del lípido.

La dilución con FuGENE se mezcló con la que contenía el DNA y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el volumen final se añadió gota a gota sobre las células. 24 h después, se eliminó todo el sobrenadante, que contenía FuGENE, y se cambió por medio fresco con suero y antibióticos añadidos.

La toxicidad producida por el lípido sobre las células fue muy baja en todos los casos.

5.1.3. Método de transfección con jetPEI

Fue empleado con las células HCT116 dado que la eficiencia de transfección con este lípido era mayor que la obtenida tanto por el método del fosfato cálcico, como por el de FuGENE. Se plaquearon $1,6 \times 10^5$ células HCT116 por pocillo de un placa de 24 pocillos. 36 h después, se eliminaron 0,5 ml de medio para reducir el volumen y así mejorar la eficiencia de la transfección. Posteriormente, se prepararon 2 mezclas diferentes por punto: por un lado, 50 μ l de NaCl (150 mM) y 1 μ g del ADN de interés, y por el otro, 50 μ l de NaCl (150 mM) y 2 μ l de jetPEI. Se unió la mezcla con el lípido a los pocillos con el ADN y, después de incubar durante 25 min a temperatura ambiente, se añadió gota a gota sobre las células. Entre 3 y 6 h después de la transfección, o incluso al día siguiente, se añadieron 0,5 ml de DMEM fresco a cada pocillo.

5.2. Transducciones mediante infecciones retrovirales

Se llevaron a cabo utilizando el plásmido **P12-MMP**, donado por el Dr. Randow (MRC, Laboratorio de Biología Molecular, Cambridge, Inglaterra). Este vector, es una versión derivada del vector pMMP, cedido por el Dr. R. Mulligan (Departamento de Genética, *Harvard Medical School* y División de Medicina Molecular, *Children's Hospital Boston*, Boston, MA, USA).

Los sobrenadantes con virus se obtuvieron transfectando las construcciones P12-MMP junto con los plásmidos que expresan las proteínas gag-pol (pMD.gag-pol) y la proteína de la envoltura VSV-G (pMD-G) en células HEK-293T modificadas de modo que expresaban de forma estable p35, Bcl-X_L y CrmA para hacerlas más resistentes a la apoptosis inducida por los genes objeto de estudio (apartado de líneas celulares).

Los virus obtenidos se utilizaron para infectar las células diana HEK-293T o HeLa diluyéndolos 1:1 en medio fresco. Las infecciones se llevaron a cabo en presencia de polibreno (8 μ g/ml, Sigma) y las placas se sometieron a centrifugación durante 1 h a 32 °C y 2000 rpm en ausencia de freno para evitar movimientos bruscos que pudieran despegar las células de la placa.

6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida e Inmunodetecciones (*western-blot*)

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, o de 10 cm para los experimentos de inmunoprecipitación, y transfectadas al día siguiente. Al final del experimento, se lisaron en un tampón constituido por un 1 % de detergente Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), 150 mM de NaCl, 50 mM de tampón Tris (pH 7.5) y 5 mM de tampón EDTA, al que se añadieron los inhibidores de proteasas aproptinina (10 µg/ml) y leupeptina (10 µg/ml), además del inhibidor PMSF (1 mM) (Roche). Después de someterse a una centrifugación de 5 min a 4 °C y 13200 rpm para eliminar los núcleos y los desechos celulares, la concentración de proteínas se midió utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad) descrito por Bradford en 1976 (Bradford, 1976). Esta técnica se basa en la reacción que sufre el colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a las proteínas. Su absorbancia pasa de 465 nm a 595 nm cuando se une a los grupos amino libres de las proteínas. La cantidad de proteínas totales de cada muestra, se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma).

A continuación, las proteínas fueron desnaturalizadas durante 10 min a 100 °C en tampón Laemmli compuesto por 50 mM Tris (pH 6,8), 5 % β-mercaptoetanol, 2 % SDS (dodecilsulfato sódico), 0,1 % Azul de bromofenol y un 10 % de glicerol (Merck), en agua. Cantidades equivalentes de proteína se resolvieron en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje, en función del tamaño de la proteína a resolver. Una vez separadas según su peso molecular, se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Immobilion, Millipore Corp.) utilizando como tampón de transferencia 25 mM Tris, 192 mM Glicina y un 20 % (v/v) de metanol.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 10 % (p/v) en tampón TBS-T (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 8 y 0,05 % Tween-20 (Sigma)) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Después de eliminar la leche lavando 3 veces con TBS-T, las membranas se hibridaron con anticuerpos primarios específicos contra PARP (Becton Dickinson), caspasa-9 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), MTCH2 (Ab3, donado por el Dr. Atan Gross, Departamento de Regulación Biológica, Instituto de Ciencias Weizmann,

Rehovot, Israel), actina (Sigma), ANT (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) AU1 o HA (Covance, Princeton, NJ, USA) durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en función del anticuerpo. Seguidamente se procedió a eliminar los restos de anticuerpo primario mediante 5 lavados con TBS-T y se incubaron las membranas, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, con el anticuerpo secundario apropiado (anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), diluido en TBS-T con leche desnatada al 1 %, excepto para los experimentos de inmunoprecipitación, donde se utilizó un 5 % de leche para bloquear mejor los sitios de unión inespecíficos y disminuir así la señal de fondo. Se eliminaron los restos de anticuerpo secundario mediante 5 lavados con TBS-T y se procedió a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL (*enhanced chemiluminescence*) o ECL plus (GE Healthcare). El peso molecular aparente de las proteínas, se estimó utilizando el marcador estándar de peso molecular Rainbow (Amersham, Biosciences).

En el caso de las membranas que fueron reutilizadas, previamente se deshibridaron con una solución de guanidina 7 M en agua (Sigma-Aldrich) durante 15 min en agitación, para eliminar los restos del anticuerpo anteriormente unido y, tras 4 lavados con TBS-T, las membranas quedaban listas para el bloqueo e inmunodetección con un nuevo anticuerpo.

7. Coinmunoprecipitaciones

Se plaquearon 3×10^6 células HEK-293T y $1,1 \times 10^6$ HeLa por placa de 10 cm. Al día siguiente, se transfectaron las células con los ADNc correspondientes por el método de precipitación con fosfato cálcico para las células HEK-293T o mediante el lípido FuGENE en el caso de las HeLa (para la coinmunoprecipitación con ANT endógeno las células HeLa fueron transducidas retroviralmente). 36 h después de la transfección, las células se lisaron como se describe en el apartado de **western blot**. Tras sustraer una alícuota de cada sobrenadante para analizar la expresión de las proteínas en los lisados totales, el resto se prelavó para eliminar posibles uniones inespecíficas con 15 μ l de la matriz de sefarosa unida a proteína G en rotación a 4 °C

durante 3 h, en el caso de células HEK-293T, y 1 h para las HeLa. Sin embargo, antes de ser utilizada, la resina de sefarosa unida a proteína G (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) y la unida al anticuerpo anti-HA monoclonal (Roche) se bloquearon durante toda la noche en rotación a 4 °C con tampón de lisis (composición descrita en el apartado de **western blot**) con BSA al 3 % (p/v) y sin inhibidores de proteasas añadidos.

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo a 4 °C y en rotación durante 1 h en el caso de HEK-293T, o 3 h en el de HeLa, utilizando 10 µl de la matriz de agarosa conjugada a un anticuerpo anti-HA monoclonal.

En los experimentos de inmunoprecipitación de la **proteína ANT endógena**, se incubaron las muestras durante 3 h con 3 µg de un anticuerpo anti-ANT soluble (Santa Cruz). Éste, una vez unido a su diana, se precipitó gracias a una incubación con 15 µl de resina de sefarosa acoplada a **proteína G** durante 1 h. Seguidamente, se efectuaron 5 lavados con tampón de lisis en el caso de las células HeLa, o tampón con un contenido de NaCl 0,9 M en el de HEK-293T. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de tampón Laemmli (2X), desnaturalizadas durante 10 min a 100 °C y, desechando la matriz precipitada, volúmenes iguales de sobrenadante fueron resueltos en geles de poliacrilamida y posteriormente incubados con un anticuerpo policlonal anti-AU (Covance).

La detección de los niveles de expresión de las moléculas en los lisados totales, se realizó mediante incubación con los anticuerpos anti-AU policlonal (Covance) diluido 1:1000, anti-HA monoclonal 1:1000 (Covance) y anti-ANT policlonal hecho en cabra a concentración 1:250 (Santa Cruz). Todos los anticuerpos empleados se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para los análisis por western blot e inmunofluorescencias.

Especificidad	Dilución	Tipo	Casa comercial
Anti-PARP	1:2000	Monoclonal	BD Biosciences ref. 556362
Anti-caspasa 9	1:1000	Monoclonal	Cell Signaling ref. #9508
Anti-MTCH2 (Ab3)	1:600	Policlonal (conejo)	Dr. A. Gross
Anti-ANT	1:250	Policlonal (cabra)	Santa Cruz ref. sc-9299
Anti-actina clon AC-40	1:1000	Monoclonal	Sigma ref. A4700
Anti-AU1	1:1000	Policlonal (conejo)	Covance ref. PRB-130P
Anti-HA	1:1000	Monoclonal	Covance ref. MMS-101P
Anti-citocromo c (IF)	1:200	Monoclonal	Becton Dickinson ref. 556432
Anti-AU (IF)	1:500	Monoclonal	Covance ref. MMS-130P
Matriz de afinidad anti-HA	10 µl/punto	Monoclonal (rata)	Roche ref. 11 815 016 001

Tabla 2. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo 2 ^{ario}	Dilución	Tipo	Casa Comercial
HRP/anti-ratón	1:5000	Policlonal (cabra)	DakoCytomation ref. P0447
HRP/anti-conejo	1:5000	Policlonal (cabra)	DakoCytomation ref. P0448
HRP/anti-cabra	1:2500	Policlonal (burro)	Santa Cruz ref. sc-2020
Cy3/anti-ratón (IF)	1:200	Policlonal (cabra)	Jackson ImmunoResearch ref. 115-165-003

(IF, inmunofluorescencia; ref, referencia)

8. Ensayos de muerte celular

8.1. Aislamiento de fragmentos apoptóticos: escalera de degradación de ADN (*DNA ladder*)

El ensayo de fragmentación del ADN, desarrollado por Herrmann en 1994 (Herrmann et al, 1994), se realizó como describieron en 1999 Pimentel-Muñíos y Seed (Pimentel-Muinos & Seed, 1999). Este método se basa en un proceso de degradación del ADN de tal modo que éste puede salir a través de los poros nucleares. Posteriormente, mediante centrifugación, los núcleos sedimentan mientras que los fragmentos de ADN permanecen en el sobrenadante.

Para evaluar el potencial apoptótico derivado de la expresión de las diferentes moléculas, se sembraron 5×10^6 células HEK-293T por punto en placas de 6 pocillos, y al día siguiente se transfectaron con los diferentes plásmidos por el método de precipitación con fosfato cálcico.

36 h después, las células se recogieron y centrifugaron durante 10 min a 4 °C y 1900 rpm. A continuación, se lavaron con PBS frío (tampón fosfato salino), se centrifugaron de nuevo y los precipitados celulares se lisaron en 100 µl de tampón de lisis, compuesto por 1 % Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) en 20 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl a pH 7,5. Después de centrifugar los tubos durante 5 min a 1600 g para precipitar los núcleos, se recogieron los lisados celulares en un nuevo tubo. Los núcleos se volvieron a tratar con tampón de lisis y se unieron los nuevos sobrenadantes a los extraídos en el paso anterior. Posteriormente, se les añadió SDS a una concentración final de 1 % y se trataron durante 2,5 h a 56 °C con 0,2 mg/ml de ARNasa por punto para eliminar el ARN. Seguidamente, se eliminaron las proteínas con 0,25 mg/ml de proteinasa K por tubo durante 3 h a 37 °C. El siguiente paso consistió en añadir la mitad de volumen de acetato de amonio 10 M, y, a continuación, 2,5 volúmenes de etanol, incubando a -70 °C entre 1,5 h y toda la noche, para precipitar el ADN. Después de centrifugar las muestras durante 40 min a 4 °C y 16100 g, se lavaron los precipitados dos veces con 1 ml de etanol al 70 % para eliminar los restos de sales del acetato de amonio y se dejaron secar en la estufa a 65 °C. Finalmente, se resuspendieron en 25 µl de TE y, los fragmentos de ADN de bajo peso molecular, se resolvieron en un gel de agarosa al 1 % (p/v). La visualización se realizó con un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

8.2. Permeabilidad celular: marcaje con IP

Para evaluar la integridad de la membrana, los cultivos se trataron con yoduro de propidio (IP) (1 µg/ml) durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y se analizó el marcaje nuclear *in vivo* mediante un microscopio de fluorescencia invertido. Se realizaron contajes de las células positivas para IP en al menos 8 campos diferentes y se contabilizaron un mínimo de 600 células por punto experimental.

8.3. Tinción nuclear con DAPI

Se observó la condensación de la cromatina nuclear, característica de los procesos apoptóticos, mediante fijación y marcaje de los núcleos con 1 µg/ml de DAPI (4',6-diamidino 2-fenilindole). Se añadieron 0,5 ml de DAPI (1 µg/ml en PBS) (Roche) incubando durante 5 min. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron y montaron con mowiol (Calbiochem) como se describe en el apartado de Inmunofluorescencias.

8.4. Citometría de flujo: marcaje con Mitotracker

Este método se empleó para medir la polarización mitocondrial en condiciones de bajos niveles de PiC. Para ello, se transfectaron células HeLa con los RNAi correspondientes, 48 h después se trataron durante 3 h con STS 1 µM y a las 72 h de la transfección se marcaron con Mitotracker (Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración final de 100 nM durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se reemplazó el medio para eliminar el marcador y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson). Los controles no transfectados con RNAi se trataron con STS 1 µM durante 6 h.

9. Técnicas de microscopía

9.1. Inmunofluorescencias

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma) colocados en placas de 24 pocillos. En el caso de HeLa, se utilizaron cubreobjetos pretratados para cultivo celular (TC, *tissue culture*, Fisher Scientific). Se plaquearon $1,35 \times 10^5$ células HEK-293T y $0,3 \times 10^5$ HeLa por pocillo y al día siguiente fueron transfectadas con los ADNs correspondientes. 36 h después, los

cubeobjetos se lavaron con PBS y las células fueron fijadas durante 15 min con paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) (Sigma-Aldrich). Tras 2 lavados con PBS, las células se permeabilizaron mediante 30 min de incubación con el detergente Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) al 0,5 % y 100 mM Glicina (1 %) en PBS 1X, para bloquear los grupos aldehído libres. Se lavaron de nuevo 2 veces con tampón salino y, posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión incubando las células durante 30 min en una solución de bloqueo con 3 % BSA en PBS. A continuación, se hibridó con un anticuerpo **anti-citocromo c** (Becton Dickinson) diluido 1/200 o **anti-AU** (Covance) a una dilución 1/500, durante 1 h y seguidamente, se incubó 1 h utilizando una dilución 1/200 de un suero anti-ratón hecho en cabra y acoplado al marcador fluorescente rojo Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los anticuerpos utilizados se detallan en las **Tablas 1 y 2** (págs 139-140). Finalmente, los cubeobjetos se montaron en un medio que contenía Mowiol 4-88 (Calbiochem) preparado como se describieron previamente Harlow y Lane en 1988 (Harlow & Lane, 1988).

Para la visualización del retículo endoplasmático (RE) mediante microscopía de fluorescencia, utilizamos una versión modificada de la proteína fluorescente roja (RFP, *red fluorescent protein*) que se expresa exclusivamente en el RE (**reRFP**), descrita en el apartado de **Construcciones de ADN**.

Para la tinción de los núcleos, se añadió el marcador **DAPI** (como se describe en el apartado de **Ensayos de muerte celular**).

La **vacuolización citoplasmática** se evaluó *in vivo* al microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 135; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) utilizando el objetivo de 20x.

En los estudios de **microscopía confocal** se utilizaron las bandas de 488 y 543 nm del láser de Argón y de Helio-Neón, respectivamente, de un microscopio confocal modelo LSM-510 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Las imágenes se importaron utilizando el software SLM-510 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.).

La microscopía confocal *in vivo* se llevó a cabo según lo descrito por Klee y Pimentel-Muñoz (Klee & Pimentel-Muñoz, 2005). Los cubreobjetos con las células transfectadas se colocaron en una placa con fondo de cristal especial para microscopía (WillCo, Amsterdam, Holanda) donde fueron analizadas con el mismo sistema confocal. La barra de escala representa 10 μm , a menos que se indique otro valor (microscopía electrónica).

La movilización del **citocromo c** se cuantificó marcando las células con un anticuerpo anti-citocromo c (como se describe en el apartado de Inmunofluorescencias). Posteriormente, se evaluó el porcentaje de células por campo que mostraban un patrón de marcaje difuso, acompañado de una señal mitocondrial débil. Se contaron al menos 600 células por cada punto experimental. Las barras de error indican las desviaciones estándar de los porcentajes obtenidos contando al menos 8 campos diferentes.

9.2. Microscopía electrónica

Las células se fijaron a las 24 y 36 h de la transfección con glutaraldehído al 2,5 % seguido de tetróxido de osmio al 1 % y con un contenido en ferricianuro potásico del 0.8 %. Después de la posterior deshidratación e inclusión en resina, se marcaron secciones ultrafinas con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo, y se observaron con un microscopio electrónico JEM-1010 (Jeol, Tokio, Japón).

10. Estudios con ARN de interferencia (ARNi)

10.1. Transfecciones con ARNi

Se plaquearon $1,7 \times 10^5$ células HeLa por punto en placas de 6 pocillos con DMEM sin antibióticos. Al día siguiente, cuando los cultivos llegaron a un 60-70 % aproximadamente de confluencia, se transfectaron con grupos prediseñados de ARN de doble cadena (On-TargetPlus, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) usando DharmaFECT1 (Dharmacon), de acuerdo con las instrucciones del producto. Los ARNi individuales dirigidos contra PiC también provenían de Dharmacon y sus secuencias eran: **PiC1**: gggcauauuuuacggauucuu; **PiC2**: gccaacacuuugagggauuu. Para abordar la transfección, en primer lugar, se prepararon 2 mezclas por punto, una de ellas contenía una dilución $2 \mu\text{M}$ del **ARNi** en tampón comercial para ARNi 1X (Dharmacon) y $125 \mu\text{l}$ de DMEM, sin antibióticos, glutamina ni suero añadidos. La segunda mezcla contenía $240 \mu\text{l}$ de DMEM, también sin aditivos, y $10 \mu\text{l}$ del lípido **DharmaFECT1**. Ambas soluciones se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se añadió la mezcla con el oligo sobre la del lípido. Pasados 20 min, el volumen total se diluyó en 2 ml de DMEM sin antibióticos y se pipeteó sobre las células, obteniendo una concentración final de ARNi de 100 nM.

10.2. Protocolo de aislamiento de ARN

La extracción del ARN total se realizó con el kit RNeasy (Qiagen). Este método, se basa en un sistema de tampones especiales altamente salinos que permiten la unión preferente a la resina de moléculas de ARN mayores de 200 bases, produciendo por tanto un enriquecimiento en ARN mensajero (ARN_m), dado que muchos de los ARNs, como los ribosómicos 5.8S y 5S, o el ARN de transferencia, que comprenden el 15-20 % de ARN total, son menores de ese tamaño.

Para abordar la purificación de ARN, se sembraron 5×10^6 células HeLa por cada placa de 10 cm. Al final del experimento, se recogieron y lisaron en $350 \mu\text{l}$ de tampón RTL (Qiagen), una solución altamente desnaturante gracias a su contenido en

β -mercaptoetanol al 1 % y guanidin-isotiocinato (GITC) que inactiva las RNAsas para asegurar el aislamiento del ARN intacto. A continuación, se añadieron 350 μ l de etanol al 70 %, que proporciona las condiciones apropiadas para la unión del ARN, y se aplicó cada muestra de lisado a la columna de *RNeasy* mediante dos adiciones de 700 μ l, seguidas cada una de 1 min de centrifugación a 10000 rpm. El ARN total se unió a la resina de sílica-gel y los contaminantes fueron eficientemente eliminados con el tampón de lavado RW1 (Qiagen). Seguidamente, la columna se trató con 80 μ l de una solución que contenía DNasa I (Roche) (70 μ l tampón RDD, 7,5 μ l agua libre de RNasa y 2,5 μ l de DNasa I) durante 15 min y posteriormente se lavó con 350 μ l de tampón de lavado. A continuación se añadieron dos volúmenes de 500 μ l de tampón RPE (Qiagen) seguidos de 1 min de centrifugación. Finalmente, se colocó la columna sobre un tubo *ependorf* tratado con sílica y libre de RNasa, y se pipetearon 30 μ l de agua libre de RNAsas sobre la columna. Después de centrifugar 1 min a 1000 rpm y repetir el proceso, se obtuvo el ARN eluido en un volumen final de 60 μ l.

Para determinar la concentración exacta de ARN, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer.

10.3. Síntesis de ADNc a partir de ARN: RT-PCR

Con objeto de obtener el ADNc para posteriormente poder amplificar por PCR específicamente las moléculas en estudio, se transcribieron 5 μ g de ARN total a ADNc mediante la transcriptasa reversa **SuperScript™ II** (Invitrogen, san Diego, CA, USA) con el siguiente procedimiento:

Desnaturalización: se incubó el ARN con 0,05 μ g/ μ l de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 μ g/ μ L) y 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en un volumen final de 10 μ l durante 5 min a 65 °C, seguido de al menos 1 min en hielo.

Anillamiento: Se mezclaron 2 μ l de tampón para la RT 10X, 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de DTT (1,4-Ditiotreitol) 0,1 M y 1 μ l del inhibidor de RNasa RNaseOUT™ (40 U/ μ l, Invitrogen). Se añadió sobre la solución con el ARN incubándose durante 2 min a 42 °C.

Síntesis de ADNc: Se añadió 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ II y se incubó durante 1 h a 42 °C.

Fin de la reacción: la reacción de síntesis se detuvo incubando a 70 °C durante 15 min y, posteriormente, se eliminó el ARN sin transcribir incubando durante 20 min a 37 °C con ARNasa H. Finalmente, el ADNc obtenido se sometió a PCR o se guardó a -20 °C hasta su utilización.

10.4. Amplificación de ADNc mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los niveles de ADNc de las moléculas analizadas, se estimaron mediante PCR semicuantitativa sobre ADN total. Para generar la reacción de PCR, se adicionaron los reactivos en el siguiente orden:

- H₂O
- Tampón comercial que contiene 150 µM MgCl₂, 1 mM Tris-HCl (pH 8,3) y 5 mM KCl
- Oligo 1 0,5 µM
- Oligo 2 0,5 µM
- Molde de ADNc 1 µg
- Mezcla de nucleótidos (dNTPs) 200 µM
- Taq polimerasa 2,5 U (ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, Roche, Basilea, Suiza)

Los oligonucleótidos empleados fueron:

PiC: **directo**, tgcttctctggtcctcaagagact, **reverso**, cagattcagtcacatttgcttg.

ANT1: **directo**, gcttgagctcctaaaggacttc, **reverso**, agggattctcaccacacaatcaat.

MTCH2: **directo**, ggtgaggagftaggacctggaaat, **reverso**, cgaaaaatcctagaatgcctctt.

Actina: **directo**, agatcaagatcattgctcctctg, **reverso**, cttgtttctgcgcaagtaggt.

La mezcla se introdujo en un termociclador iCycler (Bio-Rad) y las condiciones para la PCR fueron:

Materiales y Métodos

Desnaturalización: 4 min a 96 °C.

Amplificación: 22 ciclos para **PIC**, 24 para **MTCH2**, 26 para **ANT1** o 21 para **actina**.

Desnaturalización: 1 min a 95 °C.

Anillamiento: 1 min a 66 °C.

Extensión: 1 min a 72 °C.

Extensión final: 15 min a 72 °C.

El análisis de los productos de PCR, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE 1X con 0,5 µg/µl de bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio Rad).

Los tamaños de los diferentes fragmentos, fueron determinados gracias al marcador de peso molecular *1Kb ladder* (Invitrogen).

Bibliografía

Adams JM, Cory S (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26(1): 61-66

Albayrak T, Grimm S (2003) A high-throughput screen for single gene activities: isolation of apoptosis inducers. *Biochem Biophys Res Commun* 304(4): 772-776

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277(5324): 370-372

Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276(15): 11615-11623

Ashford TP, Porter KR (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* 12: 198-202

Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381): 1305-1308

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Siedman JG, Smith JA, Struhl K, (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York

Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V (2004) In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem J* 377(Pt 2): 347-355

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434(7033): 658-662

Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9(5): 550-555

Baker SJ, Reddy EP (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12(1): 1-9

Bandera CA, Takahashi H, Behbakht K, Liu PC, LiVolsi VA, Benjamin I, Morgan MA, King SA, Rubin SC, Boyd J (1997) Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 57(3): 513-515

Barath P, Albert-Fournier B, Luciakova K, Nelson BD (1999) Characterization of a silencer element and purification of a silencer protein that negatively regulates the human adenine nucleotide translocator 2 promoter. *J Biol Chem* 274(6): 3378-3384

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280(19): 18558-18561

Battini R, Ferrari S, Kaczmarek L, Calabretta B, Chen ST, Baserga R (1987) Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J Biol Chem* 262(9): 4355-4359

Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S (1999) Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* 147(7): 1493-1502

Belzacq AS, Vieira HL, Kroemer G, Brenner C (2002) The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie* 84(2-3): 167-176

Bernardi P (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 267(13): 8834-8839

Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 273(10): 2077-2099

Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264(3): 687-701

Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368(1): 7-18

Blachly-Dyson E, Zambronicz EB, Yu WH, Adams V, McCabe ER, Adelman J, Colombini M, Forte M (1993) Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 268(3): 1835-1841

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270(14): 7795-7798

Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, Le Fur G, Herbert JM (1999) Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 265(2): 457-461

Bortner CD, Cidlowski JA (1998) A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol* 56(12): 1549-1559

Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17): 4682-4689

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brenner C, Grimm S (2006) The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25(34): 4744-4756

Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178(2): 489-495

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34(3): 263-264

Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 264(14): 7826-7830

Broekemeier KM, Pfeiffer DR (1989) Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 163(1): 561-566

Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11(9): 3155-3162

Brower JV, Rodic N, Seki T, Jorgensen M, Fliess N, Yachnis AT, McCarrey JR, Oh SP, Terada N (2007) Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis. *J Biol Chem* 282(40): 29658-29666

Brustovetsky N, Tropschug M, Heimpel S, Heidkamper D, Klingenberg M (2002) A large Ca²⁺-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemistry* 41(39): 11804-11811

Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8(6): 569-581

Cantley LC, Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4240-4245

Caputo A, Fahey D, Lloyd C, Vozab R, McCairns E, Rowe PB (1988) Structure and differential mechanisms of regulation of expression of a serine esterase gene in activated human T lymphocytes. *J Biol Chem* 263(13): 6363-6369

Casellas P, Galiegue S, Basile AS (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40(6): 475-486

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23(16): 2825-2837

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256(5053): 97-100

Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181(3): 195-213

Classon M, Henriksson M, Sumegi J, Klein G, Hammarskjold ML (1987) Elevated c-myc expression facilitates the replication of SV40 DNA in human lymphoma cells. *Nature* 330(6145): 272-274

Clipstone NA, Crabtree GR (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357(6380): 695-697

Colombini M (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2): 107-115

Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1996) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem* 271(12): 6746-6751

Croall DE, Ersfeld K (2007) The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol* 8(6): 218

Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2): 233-249

Crompton M (2003) On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis. *Curr Med Chem* 10(16): 1473-1484

Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M (2002) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 84(2-3): 143-152

Crompton M, Virji S, Ward JM (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258(2): 729-735

Cummings J, Ward TH, Ranson M, Dive C (2004) Apoptosis pathway-targeted drugs--from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1705(1): 53-66

Chanda SK, White S, Orth AP, Reisdorph R, Miraglia L, Thomas RS, DeJesus P, Mason DE, Huang Q, Vega R, Yu DH, Nelson CG, Smith BM, Terry R, Linford AS, Yu Y, Chirn GW, Song C, Labow MA, Cohen D, King FJ, Peters EC, Schultz PG, Vogt PK, Hogenesch JB, Caldwell JS (2003) Genome-scale functional profiling of the mammalian AP-1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12153-12158

Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301(5632): 513-517

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8(3): 705-711

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4): 505-512

Cho SG, Choi EJ (2002) Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol* 35(1): 24-27

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14(5): 729-739

de Chasseval R, de Villartay JP (1992) High level transient gene expression in human lymphoid cells by SV40 large T antigen boost. *Nucleic Acids Res* 20(2): 245-250

De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F (2002) The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* 16(6): 607-609

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22(53): 8543-8567

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA, Kinnally KW (2005) Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* 16(5): 2424-2432

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Kinnally KW (2006a) Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death Differ* 13(8): 1387-1395

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (2006b) Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762(2): 191-201

DeLuca M, Hall N, Rice R, Kaplan NO (1981) Creatine kinase isozymes in human tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 99(1): 189-195

Denli AM, Hannon GJ (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28(4): 196-201

Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10(9): 369-377

Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P (2001) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276(4): 2571-2575

Dierks T, Salentin A, Kramer R (1990) Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a performed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim Biophys Acta* 1028(3): 281-288

Dolce V, Iacobazzi V, Palmieri F, Walker JE (1994) The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 269(14): 10451-10460

Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 579(3): 633-637

Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-267

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1): 33-42

DuBridges RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7(1): 379-387

Dunn WA, Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 110(6): 1923-1933

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 457-467

Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418(6899): 790-793

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662): 43-50

Ersfeld K, Barraclough H, Gull K (2005) Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol* 61(6): 742-757

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20(3): 929-935

Evan G, Littlewood T (1998) A matter of life and cell death. *Science* 281(5381): 1317-1322

Fadok VA, Henson PM (1998) Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol* 8(19): R693-695

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37(11): 719-727

Faucheu C, Diu A, Chan AW, Blanchet AM, Miossec C, Herve F, Collard-Dutilleul V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA, et al. (1995) A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J* 14(9): 1914-1922

Faustin B, Rossignol R, Rocher C, Benard G, Malgat M, Letellier T (2004) Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases. *J Biol Chem* 279(19): 20411-20421

Fiermonte G, Dolce V, Palmieri F (1998) Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J Biol Chem* 273(35): 22782-22787

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811

Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153(5): 999-1010

Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273(20): 12662-12668

Galat A, Metcalfe SM (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog Biophys Mol Biol* 63(1): 67-118

Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13(9): 1423-1433

Gewies A, Grimm S (2003) UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease. *Cancer Res* 63(3): 682-688

Gincel D, Shoshan-Barmatz V (2004) Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 36(2): 179-186

Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 358(Pt 1): 147-155

Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32(1): 37-43

Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23(16): 2891-2906

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74

Green DR, Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell* 1(1): 19-30

Green DR, Knight RA, Melino G, Finazzi-Agro A, Orrenius S (2004) Ten years of publication in cell death. *Cell Death Differ* 11(1): 2-3

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684): 626-629

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309-1312

Griffiths EJ, Halestrap AP (1991) Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. *Biochem J* 274 (Pt 2): 611-614

Grimm S (2004) The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. *Nat Rev Genet* 5(3): 179-189

Grinberg M, Schwarz M, Zaltsman Y, Eini T, Niv H, Pietrokovski S, Gross A (2005) Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 25(11): 4579-4590

Gross A (2005) Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J Bioenerg Biomembr* 37(3): 113-119

Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ (2000) Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106(9): 1127-1137

Guo L, Pietkiewicz D, Pavlov EV, Grigoriev SM, Kasianowicz JJ, Dejean LM, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Kinnally KW (2004) Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5): C1109-1117

Halestrap AP (2004) Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature* 430(7003): 1 p following 983

Halestrap AP, Brennerb C (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10(16): 1507-1525

Halestrap AP, Davidson AM (1990) Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268(1): 153-160

Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A (2000) Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28(2): 170-177

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84(2-3): 153-166

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70

Hardwick M, Fertikh D, Culty M, Li H, Vidic B, Papadopoulos V (1999) Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res* 59(4): 831-842

Harlow E, Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press

Haworth RA, Hunter DR (1980) Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol* 54(3): 231-236

Haworth RA, Hunter DR (2000) Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32(1): 91-96

Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80(2): 213-223

Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23(16): 2850-2860

Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG (2003) Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* 10(9): 956-968

Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grunke M, Woith W, Kalden JR (1994) A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 22(24): 5506-5507

Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, Schwarz MK, Church DJ, Korsmeyer SJ, Martinou JC, Antonsson B (2005) Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 280(52): 42960-42970

Hirsch T, Decaudin D, Susin SA, Marchetti P, Larochette N, Resche-Rigon M, Kroemer G (1998) PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241(2): 426-434

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299): 334-336

Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22(5): 155-156

Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4(4): 387-396

Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A (2002) DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 157(3): 455-468

Irusta PM, Chen YB, Hardwick JM (2003) Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. *Curr Opin Cell Biol* 15(6): 700-705

Itoh N, Nagata S (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268(15): 10932-10937

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66(2): 233-243

Jiang X, Wang X (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275(40): 31199-31203

Johnson N, Khan A, Virji S, Ward JM, Crompton M (1999) Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. *Eur J Biochem* 263(2): 353-359

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828): 549-554

Juhász G, Csikos G, Sinka R, Erdelyi M, Sass M (2003) The *Drosophila* homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett* 543(1-3): 154-158

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 19(21): 5720-5728

Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 24(6): 980-991

Katz Y, Ben-Baruch G, Kloog Y, Menczer J, Gavish M (1990) Increased density of peripheral benzodiazepine-binding sites in ovarian carcinomas as compared with benign ovarian tumours and normal ovaries. *Clin Sci (Lond)* 78(2): 155-158

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA (1994) Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3515-3519

Kawasaki H, Taira K (2003) Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* 31(2): 700-707

Keon BH, Schafer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW (1996) Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134(4): 1003-1018

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): 2013-2026

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-257

Kim YH, Haidl G, Schaefer M, Egner U, Mandal A, Herr JC (2007) Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Dev Biol* 302(2): 463-476

King KL, Cidlowski JA (1995) Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58(2): 175-180

Kinnally KW, Antonsson B (2007) A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12(5): 857-868

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22): 5579-5588

Kiss-Toth E, Qvarnstrom EE, Dower SK (2004) Hunting for genes by functional screens. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(2-3): 97-102

Klee M, Pimentel-Muinos FX (2005) Bcl-X(L) specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168(5): 723-734

Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290(5497): 1717-1721

Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303): 1132-1136

Ko YH, Delannoy M, Hüllihen J, Chiu W, Pedersen PL (2003) Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 278(14): 12305-12309

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427(6973): 461-465

Kroemer G (1999) Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp* 66: 1-15

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9(13): 1277-1287

Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6(5): 513-519

Kumar S, Lavin MF (1996) The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 3(3): 255-267

Lamarca V, Marzo I, Sanz-Clemente A, Carrodegua JA (2008) Exposure of any of two proapoptotic domains of presenilin 1-associated protein/mitochondrial carrier homolog 1 on the surface of mitochondria is sufficient for induction of apoptosis in a Bax/Bak-independent manner. *Eur J Cell Biol*

Lamarca V, Sanz-Clemente A, Perez-Pe R, Martinez-Lorenzo MJ, Halaihel N, Muniesa P, Carrodegua JA (2007) Two isoforms of PSAP/MTCH1 share two proapoptotic domains and multiple internal signals for import into the mitochondrial outer membrane. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(4): C1347-1361

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor

T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921

LeBlanc AC (2003) Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2): 215-229

Lee NG, Yamaguchi J, Subramanian KN (1991) Efficient replication of plasmids containing the SV40 origin in N-myc overexpressing human neuroblastoma cells. *Oncogene* 6(7): 1161-1169

Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20(5): 500-505

Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 589-598

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 177-196

Levine B (2007) Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 446(7137): 745-747

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4): 491-501

Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842): 95-99

Liu QA, Hengartner MO (1999) The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 887: 92-104

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147-157

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2): 175-184

Lock RB, Stribinskiene L (1996) Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res* 56(17): 4006-4012

Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2405-2419

Lunardi J, Attardi G (1991) Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells. *J Biol Chem* 266(25): 16534-16540

Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3739-3744

Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N (2004) Hexokinase-mitochondria

interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 16(5): 819-830

Martinez-Caballero S, Dejean LM, Jonas EA, Kinnally KW (2005) The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* 37(3): 155-164

Martinez-Caballero S, Dejean LM, Kinnally KW (2004) Some amphiphilic cations block the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *FEBS Lett* 568(1-3): 35-38

Marx A, Nugoor C, Muller J, Panneerselvam S, Timm T, Bilanz M, Mylonas E, Svergun DI, Mandelkow EM, Mandelkow E (2006) Structural variations in the catalytic and ubiquitin-associated domains of microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase (MARK) 1 and MARK2. *J Biol Chem* 281(37): 27586-27599

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998a) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281(5385): 2027-2031

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998b) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187(8): 1261-1271

Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S (2003) Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22(21): 3307-3318

Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, Nakamura Y (1998) Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer* 21(3): 230-235

Mayr JA, Merkel O, Kohlwein SD, Gebhardt BR, Bohles H, Fotschl U, Koch J, Jaksch M, Lochmuller H, Horvath R, Freisinger P, Sperl W (2007)

Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am J Hum Genet* 80(3): 478-484

McGuinness O, Yafei N, Costi A, Crompton M (1990) The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane Ca(2+)-dependent pore. *Eur J Biochem* 194(2): 671-679

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16(10): 2794-2804

Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407(6805): 796-801

Melendez A, Talloczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638): 1387-1391

Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, Helen P, Sallinen P, Harjuntausta T, Helin H, Alho H (1995) Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res* 55(12): 2691-2695

Miki H, Suetsugu S, Takenawa T (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 17(23): 6932-6941

Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385(6614): 353-357

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75(4): 653-660

Mizushima N (2004) Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2491-2502

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15(3): 1101-1111

Mortimore GE, Poso AR (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* 7: 539-564

Mortimore GE, Poso AR, Lardeux BR (1989) Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes Metab Rev* 5(1): 49-70

Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48(5): 899-907

Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9893-9898

Murphy RC, Schneider E, Kinnally KW (2001) Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 497(2-3): 73-76

Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88(3): 355-365

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434(7033): 652-658

Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ (1999) Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 18(9): 2330-2341

Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306

Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ (1997) Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): C1286-1294

Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12(5): 231-235

O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, Koretsky AP, Brdiczka D, Wallimann T (1997) The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 414(2): 253-257

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267(15): 10709-10715

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4): 609-619

Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 278(20): 17636-17645

Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S, Balija V, O'Shaughnessy A, Gnoj L, Scobie K, Chang K, Westbrook T, Cleary M, Sachidanandam R, McCombie WR, Elledge SJ, Hannon GJ (2004) A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428(6981): 427-431

Palmieri F (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447(5): 689-709

Panneerselvam S, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E (2006) Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Par-1. *Structure* 14(2): 173-183

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 402-409

Papadopoulos V, Dharmarajan AM, Li H, Culty M, Lemay M, Sridaran R (1999) Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression. Correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem Pharmacol* 58(9): 1389-1393

Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412(6842): 90-94

Pastorino JG, Hoek JB (2003) Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 10(16): 1535-1551

Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277(9): 7610-7618

Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155(5): 725-731

Pennica D, King KL, Shaw KJ, Luis E, Rullamas J, Luoh SM, Darbonne WC, Knutzon DS, Yen R, Chien KR, et al. (1995) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1142-1146

Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 10(12): 1243-1254

Pils B, Schultz J (2004) Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes. *J Mol Biol* 340(3): 399-404

Pimentel-Muinos FX, Seed B (1999) Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 11(6): 783-793

Poncet D, Pauleau AL, Szabadkai G, Voza A, Scholz SR, Le Bras M, Briere JJ, Jalil A, Le Moigne R, Brenner C, Hahn G, Wittig I, Schagger H, Lemaire C, Bianchi K, Souquere S, Pierron G, Rustin P, Goldmacher VS, Rizzuto R, Palmieri F, Kroemer G (2006) Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol* 174(7): 985-996

Pratt R, Vallis LM, Lim CW, Chisnall WN (1987) Mitochondrial creatine kinase in cancer patients. *Pathology* 19(2): 162-165

Prindull G (1995) Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31A(1): 116-123

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112(12): 1809-1820

Rabizadeh S, Xavier RJ, Ishiguro K, Bernabeortiz J, Lopez-Illasaca M, Khokhlatchev A, Mollahan P, Pfeifer GP, Avruch J, Seed B (2004) The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem* 279(28): 29247-29254

Rasola A, Bernardi P (2007) The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12(5): 815-833

Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11(9): 1107-1117

Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17(25): 3225-3236

Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1(1): 11-21

Rempel A, Mathupala SP, Griffin CA, Hawkins AL, Pedersen PL (1996) Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Res* 56(11): 2468-2471

Robbins PF, el-Gamil M, Li YF, Topalian SL, Rivoltini L, Sakaguchi K, Appella E, Kawakami Y, Rosenberg SA (1995) Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 154(11): 5944-5950

Robey RB, Hay N (2006) Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25(34): 4683-4696

Rodic N, Oka M, Hamazaki T, Murawski MR, Jorgensen M, Maatouk DM, Resnick JL, Li E, Terada N (2005) DNA methylation is required for silencing of ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* 23(9): 1314-1323

Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4(5): 303-313

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3(7): 619-625

Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 273(17): 10232-10239

Ruegg UT, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10(6): 218-220

Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2(8): 553-555

Saito S, Araki W (2005) Expression profiles of two human APH-1 genes and their roles in formation of presenilin complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 327(1): 18-22

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662): 96-99

Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): 401-410

Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805): 784-788

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* 274(32): 22532-22538

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5113-5118

Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12005-12010

Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11357-11362

Schmid J, Weissmann C (1987) Induction of mRNA for a serine protease and a beta-thromboglobulin-like protein in mitogen-stimulated human leukocytes. *J Immunol* 139(1): 250-256

Schobel S, Neumann S, Seed B, Lichtenthaler SF (2006) Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci* 24(2-3): 141-148

Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S (2004) The metastasis suppressor gene C33/CD82/KAI1 induces apoptosis through reactive oxygen intermediates. *FASEB J* 18(1): 158-160

Schubert A, Grimm S (2004) Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor. *Cancer Res* 64(1): 85-93

Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7(3): 253-266

Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 107-113

Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9(3): 459-470

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1455-1459

Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6(12): 1221-1228

Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3100-3105

Shimizu S, Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 152(2): 237-250

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399(6735): 483-487

Shimizu S, Tsujimoto Y (2000) Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 577-582

Shinohara Y, Ichihara J, Terada H (1991) Remarkably enhanced expression of the type II hexokinase in rat hepatoma cell line AH130. *FEBS Lett* 291(1): 55-57

Shoshan-Barmatz V, Israelson A (2005) The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol* 204(2): 57-66

Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 12(18): 2249-2270

Shuey DJ, McCallus DE, Giordano T (2002) RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today* 7(20): 1040-1046

Silva JM, Marran K, Parker JS, Silva J, Golding M, Schlabach MR, Elledge SJ, Hannon GJ, Chang K (2008) Profiling essential genes in human mammary cells by multiplex RNAi screening. *Science* 319(5863): 617-620

Simons A, Dafni N, Dotan I, Oron Y, Canaani D (2001a) Establishment of a chemical synthetic lethality screen in cultured human cells. *Genome Res* 11(2): 266-273

Simons AH, Dafni N, Dotan I, Oron Y, Canaani D (2001b) Genetic synthetic lethality screen at the single gene level in cultured human cells. *Nucleic Acids Res* 29(20): E100

Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5(9): 834-839

Smedley D, Hamoudi R, Lu YJ, Cooper C, Shipley J (1999) Cloning and mapping of members of the MYM family. *Genomics* 60(2): 244-247

Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14376-14381

Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 11(10): 1066-1075

Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81(4): 513-523

Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC (1992) Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 267(21): 14592-14597

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718): 441-446

Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R (2001) Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(15): 8662-8667

Szabo I, De Pinto V, Zoratti M (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 330(2): 206-210

Szabo I, Zoratti M (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* 330(2): 201-205

Tafari M, Minchenko DA, Serroni A, Farber JL (2001) Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res* 61(6): 2459-2466

Takagaki Y, Manley JL (2000) Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol* 20(5): 1515-1525

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74(5): 845-853

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456-1462

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372): 768-774

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281(5381): 1312-1316

Ting A, Lichtenthaler S, Xavier R, Na SY, Rabizadeh S, Holmes T, Seed B (2005) Large-scale screens for cDNAs with in vivo activity. *Novartis Found Symp* 267: 219-229; discussion 229-230

Trapani JA, Klein JL, White PC, Dupont B (1988) Molecular cloning of an inducible serine esterase gene from human cytotoxic lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18): 6924-6928

Tsujimoto Y (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195(2): 158-167

Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S (2006) Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1297-1300

Tsujimoto Y, Shimizu S (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12(5): 835-840

Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333(1-2): 169-174

Van Cruchten S, Van Den Broeck W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31(4): 214-223

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91(5): 627-637

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz

B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351

Venturini I, Zeneroli ML, Corsi L, Avallone R, Farina F, Alho H, Baraldi C, Ferrarese C, Pecora N, Frigo M, Ardizzone G, Arrigo A, Pellicci R, Baraldi M (1998) Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 63(14): 1269-1280

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102(1): 43-53

Verrier F, Deniaud A, Lebras M, Metivier D, Kroemer G, Mignotte B, Jan G, Brenner C (2004) Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene* 23(49): 8049-8064

Verrier F, Mignotte B, Jan G, Brenner C (2003) Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 126-142

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22(10): 388-393

Vinogradov A, Scarpa A, Chance B (1972) Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys* 152(2): 646-654

Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8): 789-799

von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150(5): 1027-1036

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78(2): 343-352

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP (1998) Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 10(3): 279-288

Wang CW, Klionsky DJ (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 9(3-4): 65-76

Wang Y, Li X, Wang L, Ding P, Zhang Y, Han W, Ma D (2004) An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1525-1532

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14(16): 2060-2071

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292(5517): 727-730

Westbrook TF, Stegmeier F, Elledge SJ (2005) Dissecting cancer pathways and vulnerabilities with RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70: 435-444

Wilson JE (1995) Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 126: 65-198

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370(6487): 270-275

Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 336 (Pt 2): 287-290

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756): 555-556

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-1331

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14559-14563

Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9(10): 1102-1109

Xu X, Shi YC, Gao W, Mao G, Zhao G, Agrawal S, Chisolm GM, Sui D, Cui MZ (2002) The novel presenilin-1-associated protein is a proapoptotic mitochondrial protein. *J Biol Chem* 277(50): 48913-48922

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303): 1129-1132

Yerushalmi GM, Leibowitz-Amit R, Shaharabany M, Tsarfaty I (2002) Met-HGF/SF signal transduction induces mimp, a novel mitochondrial carrier homologue, which leads to mitochondrial depolarization. *Neoplasia* 4(6): 510-522

Yoshimori T (2004) Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun* 313(2): 453-458

Yu PW, Huang BC, Shen M, Quast J, Chan E, Xu X, Nolan GP, Payan DG, Luo Y (1999) Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol* 9(10): 539-542

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75(4): 641-652

Zamora M, Granel M, Mampel T, Vinas O (2004) Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett* 563(1-3): 155-160

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101(1): 25-33

Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 67-71

Zarbl H, Sukumar S, Martin-Zanca D, Santos E, Barbacid M (1985) Molecular assays for detection of ras oncogenes in human and animal tumors. *Carcinog Compr Surv* 9: 1-16

Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M (1994) NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* 269(3): 1614-1616

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15(12): 1481-1486

Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241(2): 139-176

Zoratti M, Szabo I, De Marchi U (2005) Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2): 40-52

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274(17): 11549-11556

Abreviaturas

Ab	<i>Antibody</i> (anticuerpo)
ADNc	ADN complementario
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i> (factor inductor de apoptosis)
ANT	<i>Adenine Nucleotide Translocase</i> (transportador de nucleótidos adenina)
Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activator factor 1</i>
APH1	<i>Pharynx Defective 1 Homolog</i>
APP	Precursor de la proteína beta-amiloide
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
Arp2/3	<i>Actin-related proteins 2/3</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
Atr	Atractilato o Atractilósido
BA	<i>Bongkrelic Acid</i> (ácido bongcrékico)
Bci1	<i>Bax channel inhibitor</i> (inhibidor del canal de Bax)
BH	<i>Bcl-2 Homology</i>
BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>
BNIP3L	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3-like</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (seroalbúmina bovina)
C9.DN	Caspasa-9 Dominante-Negativa
CAD	<i>Caspase-Activated DNase</i> (DNAsa caspasa-activada)
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i> (dominio de reclutamiento y activación de caspasas)
CBR	Receptor Central de Benzodiazepina
CD5	<i>Cluster of Differentiation 5 molecule</i>
CKm o CPK	Creatín quinasa mitocondrial o creatín fosfoquinasa
CMV	Citomegalovirus
CrmA	<i>Cytokine response modifier A</i>
CsA	Ciclosporina A

Abreviaturas

C-terminal	Carboxilo terminal
CypD	<i>Cyclophilin D</i> (ciclofilina D)
CytC	Cytocrome c (citocromo c)
DAPI	<i>4', 6-diamidino 2-phenylindole</i>
DAPK	<i>Death-Associated Protein Kinase</i> (proteín quinasa asociada a muerte)
DD	<i>Death Domain</i> (dominio de muerte)
DED	<i>Death Effector Domain</i> (dominio efector de muerte)
DFF	<i>DNA Fragmentation Factor</i> (factor de fragmentación del ADN)
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex</i> (complejo de señalización inductor de muerte)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DTT	1,4-Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Etilen-diamino-tetra-acetato
EMK	<i>ELKL Motif Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (citometría de flujo)
FADD/MORT	<i>FAS-Associated Death Domain Protein/Mediator of Receptor-Induced Toxicity</i>
Fas/CD95/APO-1	<i>Cytotoxicity-Dependent protein 95/Apoptosis-1 protein</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (suero bovino fetal)
FL	<i>Full Length</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína fluorescente verde)
GITC	Guanidin-istiocinato
HA	Hemaglutinina
HCT116	<i>Human Colon Cancer cells 116</i>
HEBS	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> (células embrionarias de riñón humano)

HeLa	Células de adenocarcinoma de cérvix de Henrietta Lacks
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (factor de crecimiento de hepatocitos)
HKm	Hexokinasa mitocondrial
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
I	Irregular
IAP	<i>Inhibitor Apoptosis Protein</i> (proteína inhibidora de apoptosis)
iCAD	<i>Inhibitor Caspase-Activated DNase</i>
ICE	<i>Interleukin-1 beta-converting enzyme</i>
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1/2 IL-3	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> (factor de crecimiento de la insulina tipo 1)
IGFR-1	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor 1</i> (receptor del factor de crecimiento de la insulina tipo 1)
IL-3	Interleuquina 3
IP	Ioduro o Yoduro de Propidio
JNK	<i>Jun Kinase</i>
LB	Luria-Bertani
LC3	<i>Light-Chain 3</i> (cadena ligera 3)
MAC	<i>Mitochondrial Apoptosis-inducing Channel</i> (canal inducido por apoptosis mitocondrial)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteín quinasa mitogen-activada)
MARK2	<i>Microtubule Affinity-Regulated Kinase-2</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> (fibroblastos embrionarios murinos)
mGFP	<i>mitochondrial Green Fluorescent Protein</i>
MME	Membrana Mitocondrial Externa
MMI	Membrana Mitocondrial Interna
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i> (permeabilización de la membrana mitocondrial externa)

Abreviaturas

MPCD	<i>Mitochondrial Phosphate Carrier Deficiency</i> (deficiencia del transportador mitocondrial de fosfato)
MPT	<i>Mitochondrial Permeability Transition</i> (transición de permeabilidad mitocondrial)
MTCH1/PSAP(L ó S)	<i>Mitochondrial Carrier Homolog 1/Presenilin Associated Protein (Large or Short isoform)</i>
MTCH2	<i>Mitochondrial Carrier Homolog 2</i>
N-terminal	Amino terminal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Investigación Biotecnológica)
NF-kappa-B (NF-κB)	<i>Nuclear Factor κB</i> (factor nuclear κB)
NIP	<i>BCL2/adenovirus 19kDa-interacting protein</i>
p10	subunidad pequeña de las caspasas
p20	subunidad grande de las caspasas
PARP	poli-(ADP-ribosa) polimerasa
PBR	<i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i> (Receptor periférico de la benzodiacepina)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
PCD	<i>Program Cell Death</i> (muerte celular programada)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PFA	Paraformaldehído
Pi	<i>Inorganic Phosphate</i> (fosfato inorgánico)
PiC	<i>Phosphate Carrier</i> (transportador de fosfato)
PIR121	<i>Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2</i>
PMSF	<i>Phenylmethyl sulphonyl fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
PPlasa	Peptidil prolil-cis trans-isomerasa
PS	Fosfatidilserina
PTP o PTPC	<i>Permeability Transition Pore Complex</i> (poro de transición de permeabilidad)

p/v	peso/volumen
PVDF	Polivinilideno difluoruro
R	Regular
RE	Retículo Endoplasmático
Ref	Referencia
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>
reRFP	<i>Red Fluorescent Protein</i> retículo endoplasmático
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i> (proteína fluorescente roja)
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SLC25	<i>Human mitochondrial solute carrier gene family</i>
Smac/Diablo	<i>Second Mitochondrial-derived Activator Caspase/Direct linh inhibitor of Apoptosis-Binding protein with low pl</i>
STS	Estaurosporina
SV40	<i>Simian Vacuolating Virus 40</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq polimerasa	polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
tBid	Bid truncado
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline-Tween</i>
TC	<i>Tissue Culture</i>
TE	Tris EDTA
TM	Transmembrana
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (factor de necrosis tumoral)
TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i> (receptor 1 del factor de necrosis tumoral)
TR	Truncado
TRADD	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain protein</i>
TSP0	<i>Translocator Protein</i>
v/v	volumen/volumen

Abreviaturas

VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i> (canal aniónico dependiente de voltaje)
WB	<i>Western Blot</i>

Anexo: Publicación

ORIGINAL ARTICLE

A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome *c* release

S Alcalá, M Klee, J Fernández, A Fleischer and FX Pimentel-Muiños

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

Functional annotation of complex genomes requires the development of novel experimental platforms with increased capacity. Here, we describe a high-throughput system designed to identify cDNAs whose overexpression induces morphologically distinct cell death modalities. The methodology incorporates two robotized steps, and relies on coexpression of library clones with GFP to reveal the morphological features presented by the dying cells. By using this system we screened 135 000 cDNA clones and obtained 90 independent molecules. Interestingly, three death categories were identified, namely; apoptotic, vacuolated and autophagic. Among the pro-apoptotic clones, we found four members of the mitochondrial carrier family: the phosphate and adenine nucleotide (type 3) transporters, and the mitochondrial carrier homologs (MTCHs) 1 and 2. Expression of these molecules induced cytochrome *c* release and caspase-9-dependent death. One of them, the phosphate carrier, was able to interact with members of the permeability transition pore complex ANT1 and VDAC1, and its binding to ANT1 was stabilized in the presence of apoptotic activators. Depletion of this carrier by siRNA delayed cytochrome *c* mobilization and apoptosis. These results attribute a previously undescribed apoptotic function to the phosphate carrier and, more generally, suggest that a common property of various mitochondrial transporters was exploited during evolution to regulate apoptosis.

Oncogene (2008) 27, 44–54; doi:10.1038/sj.onc.1210600; published online 9 July 2007

Keywords: high-throughput screening; atypical cell death; apoptosis; permeability transition; phosphate carrier

Introduction

The complete genomes of a number of organisms have been recently sequenced and functional annotation of all genes uncovered constitutes one of the challenges of the post-genomic era. To address this issue, a substantial

effort has been made to design experimental methodologies with increased analytical capacity (Grimm, 2004; Kiss-Toth *et al.*, 2004). One of them is a variation of expression cloning where cDNA collections are expressed in cultured cells and tested for their ability to regulate simple readout reporters (Grimm, 2004; Kiss-Toth *et al.*, 2004; Ting *et al.*, 2005). The recent advent of high-throughput robotic systems facilitates massification of these approaches, turning them into powerful tools for functional gene discovery. Most of these methods rely on a property that signal transduction mediators often share: the ability to induce downstream signaling upon overexpression in susceptible cells. For example, transfection of molecules involved in nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation stimulates the signaling pathway, a feature that has been exploited in screenings aimed at finding NF- κ B inducers (Matsuda *et al.*, 2003). A comparable rationale has supported the design of cloning systems to identify activators of the MAPK pathway (Chanda *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2003) or modifiers of amyloid protein shedding (Schobel *et al.*, 2006). Similarly, expression of apoptotic mediators activates the death program and, based on this, massive screenings to find pro-apoptotic clones have been developed (Albayrak and Grimm, 2003).

Although apoptosis is the paradigm of programmed cell death, other forms of cell demise are also genetically regulated (Broker *et al.*, 2005). Apart from relying on alternative molecular mechanisms, these atypical death modes are accompanied by changes in cellular morphology that are markedly distinct from the blebbing and cell shrinkage that characterize apoptosis (Broker *et al.*, 2005). For example, autophagic (Type II) cell death causes cells to detach from the substrate and adopt a ballooned appearance (Shimizu *et al.*, 2004). In turn, paraptosis, or Type III death, involves extensive cytoplasmic vacuolization (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002; Broker *et al.*, 2005). Several examples suggest that overexpression of molecules involved in atypical death also activates the execution machinery. Death-associated protein kinase plays a role in autophagic death, and its expression induces this type of cell demise (Inbal *et al.*, 2002). BCL2/adenovirus 19 kD-interacting protein (NIP) mediates arsenic trioxide-induced autophagy and activates autophagic death upon transfection (Kanzawa *et al.*, 2005). Similarly,

Correspondence: Dr FX Pimentel-Muiños, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca 37007, Spain.

E-mail: fpx@usal.es

Received 11 December 2006; revised 18 April 2007; accepted 18 May 2007; published online 9 July 2007

paraptotic death is induced by expression of insulin-like growth factor-I receptor (Sperandio *et al.*, 2000).

Given these premises, we reasoned that we could identify signaling mediators involved in a variety of death programs by screening cDNA expression libraries for clones capable of inducing morphologically distinct cell death modalities. To design this cloning system, we relied on robotic devices able to handle an extensive collection of clones. Co-transfection of library DNA with a plasmid expressing green fluorescent protein (GFP), facilitated identification of the morphological features associated with cell death. The library was divided in pools of an optimized size to increase the capacity of the system.

We describe here the completion of this cloning scheme over 135 000 clones of a human cDNA library. The screening resulted in the identification of 90 clones able to induce three different morphological classes of cell death, only one of them being clearly apoptotic. We also show that one of the confirmed pro-apoptotic molecules, the mitochondrial phosphate carrier (PiC), has a previously undescribed role in the release of cytochrome *c* from mitochondria during apoptosis.

Results

To develop a screening system based on the analysis of pooled library clones, we first established the optimal pool size. Plasmids expressing known pro-apoptotic molecules were progressively diluted in empty plasmid

DNA, mixed with a vector expressing GFP and transfected into 293T cells. The appearance of apoptotic signs was detectable even at dilutions as low as 1/100, owing to the presence of GFP in transfected cells (not shown). On the basis of these results, we chose a pool size of 96 clones for the initial screening step of a high-throughput protocol designed to identify molecules whose expression induces cell death (Figure 1).

By applying this scheme to 135 000 clones of a human expression library, we isolated 229 cDNAs able to provoke morphological alterations in transfected cells that were compatible with cellular demise. To confirm the loss of viability, we verified the induction of an increased permeability to propidium iodide (PI). A total of 181 clones caused positive PI staining (not shown), indicating that 48 molecules triggered morphological changes that did not result in actual death. Most of these were 'weak inducers' of cell death, usually identified in primary pools also containing a 'strong inducer'. Sequencing of the killer clones reduced the collection to 90 non-redundant members (Table 1). Several cDNAs were established apoptotic mediators, such as BAX, caspase-4, the voltage-dependent anion channel-1 (VDAC1) or CD95 (Table 1), thus validating the capacity of the system to identify meaningful regulators.

Although most clones induced the canonical apoptotic morphology, a number of them provoked atypical alterations suggestive of alternative death modalities. Thus 12 molecules caused cytoplasmic vacuolization, while 14 induced collapse of the cellular content inside ballooned, floating structures (Table 1). Representative examples of these phenotypes are shown in Figure 2a.

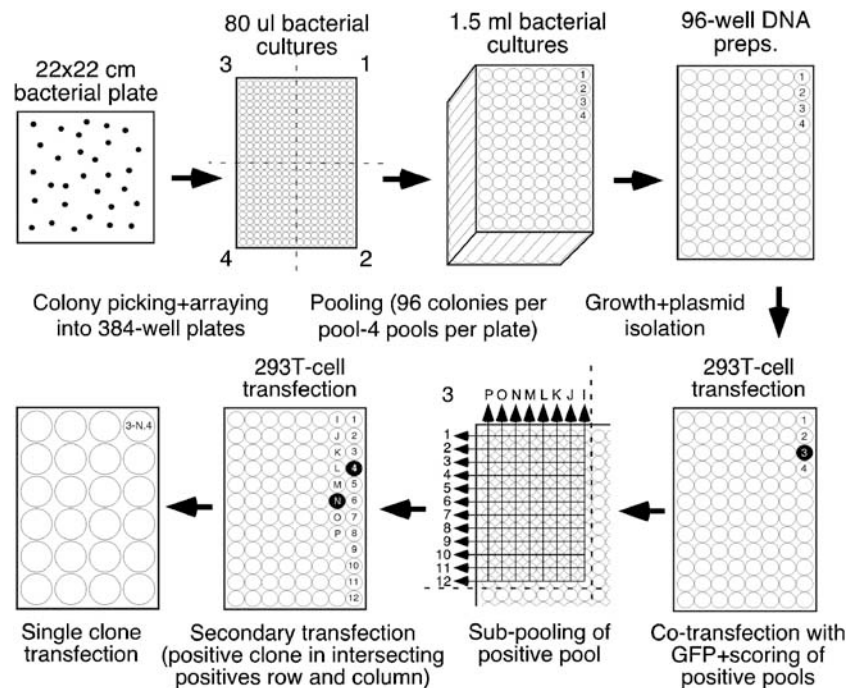


Figure 1 Expression-cloning scheme. cDNA library clones were arrayed into 384-well plates. Ninety-six colony pools were subsequently generated from each of the four indicated plate sectors. Pool plasmid DNA was then cotransfected with a plasmid expressing GFP into 293T cells, and death was detected 36 h later. Isolation of positive clones was carried out by subpooling all rows and columns of each positive pool and cotransfecting the resulting 24-plasmid preparations with GFP. Positive clones were located at the intersection between positive rows and columns.

Table 1 List of cloned molecules

<i>Family</i>	<i>Molecule^a</i>	<i>Death mode^b</i>	<i>Score^c</i>
Mitochondrial carriers	ANT3 (FL; NM_001636)	Apoptotic	+++
	Phosphate carrier (FL; NM_002635)	Apoptotic	+++
	MTCH1b (TR; NM_014341)	Apoptotic	+++
	MTCH2 (FL; NM_014342)	Vac.(I)/Apoptotic	+
Mitochondria	TIMM17 (FL; NM_006335)	Apoptotic	+
	TOMM20 (FL; NM_014765)	Apoptotic	++
	VDAC1 (FL; NM_003374)	Apoptotic	+
	Mitoch. translation optim. homolog (TR; NM_012123)	Apoptotic	++
Cell signaling	Ras-related proto-oncogene, RALB (FL; NM_002881)	Vacuolated (R)	++
	GNAS-transcript 1 (TR; NM_000516)	Apoptotic	++
	RAC2 (FL; NM_002872)	Ballooned	+
	TRAF3-interacting protein (TR; NM_025228)	Apoptotic	+
	RHOA (FL; NM_001664)	Apoptotic	+
	SAM SH3 domains, SAMSN1 (TR; NM_022136)	Apoptotic	++
	Feline sarcoma proto-oncogene, FES (TR; NM_002005)	Apoptotic	+++
	Ras-like without CAAX-1, RIT1 (FL; NM_006912)	Vacuolated (R)	++
	Megakaryocyte assoc. kinase, MATK (TR; NM_139354)	Apoptotic	++
	FMR1-interacting protein 2, CYFIP2 (TR; NM_014376)	Apoptotic	++
	RHOH (FL; NM_004310)	Apoptotic	+
Apoptosis	RIPK3 (FL; NM_006871)	Apoptotic	+++
	BNIP3L (FL; NM_004331)	Apoptotic	+++
	BAX (FL; NM_138761)	Apoptotic	+++
	Caspase-4 (FL; NM_001225)	Apoptotic	++
	Caspase-1 (FL; NM_033292)	Apoptotic	++
	CD95 (FL; NM_152872)	Apoptotic	+++
	Granzyme B (FL; NM_004131)	Apoptotic	+++
Membrane proteins	MHC-I (TR; NM_002116)	Apoptotic	++
	Cysteinyl leukotriene receptor-1 (FL; NM_006639)	Vacuolated (I)	+
	CD48 (TR; NM_001778)	Apoptotic	+
	CD7 (TR; NM_006137)	Apoptotic	+
	CD74 (TR; NM_004355)	Vacuolated (I)	+
Metabolism	GAPDH (TR; NM_002046)	Apoptotic	+
	Holocytochrome <i>c</i> synthase (FL; NM_005333)	Apoptotic	+
	ATP-synthase F1 (TR; NM_001686)	Apoptotic	+
	Glucose phosphate isomerase (TR; NM_000175)	Ballooned	+
	Quinolate phosphoribosyl-transferase (FL; NM_014298)	Apoptotic	+
	ATP-synthase F0 (FL; NM_006476)	Apoptotic	+
	Cytochrome <i>c</i> oxidase-subunit IV (FL; NM_001861)	Apoptotic	++
	Succinate dehydrogenase C (TR; NM_003001)	Apoptotic	++
	Cytochrome <i>c</i> assembly 1-like, OXA1L (TR; NM_005015)	Apoptotic	+
	Elongation very long fatty acids-like (TR; NM_022821)	Ballooned	+
	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (TR; NM_000182)	Ballooned	+
Phosphofructo kinase (TR; NM_002627)	Ballooned	+	
Miscellaneous	Exportin 1 (TR; NM_003400)	Apoptotic	+
	Nucleoporin-205 (TR; NM_015135)	Apoptotic	+++
	CHMP family member 7 (TR; NM_152272)	Apoptotic	++
	Microfibrillar-assoc. prot. 1, MFAP1 (TR; NM_005926)	Apoptotic	++
	Pharynx defective 1 homolog, APH1b (FL; NM_031301)	Vacuolated (I)	++
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R (FL; NM_017811)	Vacuolated (I)	+
	Ribosomal protein large P0 (TR; NM_001002)	Apoptotic	+
	Adrenocortical insufficiency (FL; NM_015665)	Apoptotic	+++
	Translation elongation factor 1 (TR; NM_001402)	Apoptotic	+
	Methionyl aminopeptidase 1 (TR; NM_015143)	Apoptotic	+
	MARK2 (TR; NM_017490)	Vacuolated (R)	+
	Na/K transporting ATPase (TR; NM_001001586)	Apoptotic	++
	Translation initiation factor 3 (TR; NM_003754)	Ballooned	+
	ADP-ribosylation-like factor int prot. 5 (TR; NM_006407)	Ballooned	+
	High mobility gr.-Nucleosome binding (TR; NM_004965)	Ballooned	+
	Myxovirus resistance 1 (TR; NM_002462)	Apoptotic	+
	c-EBP-zeta (TR; NM_005760)	Apoptotic	++
	Reticulon 3 (TR; NM_006054)	Vacuolated (I)	+

Table 1 (continued)

Family	Molecule ^a	Death mode ^b	Score ^c
	Phosphatase-interacting prot. PSTPIP1(FL; NM_003978)	Vacuolated (R)	+
	Transaldolase 1 (TR; NM_006755)	Apoptotic	+
	Aurora kinase A6 (TR; NM_198437)	Ballooned	+
	Cytohesin 2 (FL; NM_004228)	Vacuolated (I)	+
	Ribosomal protein L10a (TR; NM_007104)	Ballooned	++
	Branched chain aminotransferase 2 (TR; NM_001190)	Vacuolated (I)	+
	Symplekin (TR; NM_004819)	Apoptotic	++
	T cell receptor alpha chain (FL; AY247836)	Apoptotic	+++
	FUS (TR; NM_004960)	Apoptotic	+
	Heat shock protein 70, HSPA8 (TR; NM_006597)	Apoptotic	+
	Chaperonin containing TCP1 (TR; NM_012073)	Apoptotic	+
	MutS homolog 2, MSH2 (TR; NM_000251)	Apoptotic	+
	Secretory carrier membr. prot. 3 (TR; NM_005698)	Ballooned	+
	Annexin A7 (TR; NM_004034)	Apoptotic	+
	Syntaxin 4 (TR; NM_004604)	Ballooned	+
	IL32 (FL; NM_004221)	Ballooned	+
	UBX domain containing 2 (TR; NM_014607)	Apoptotic	++
Unknown	FAM104A (FL; NM_032837)	Vacuolated (I)	+
	Zn-finger containing MYM6 (FL; BC029439)	Ballooned	++
	Putative dehydrogenase, CGI49 (TR; NM_016002)	Apoptotic	+++
	Hypothetical protein (TR; XM_941317)	Apoptotic	+++
	DENN/MADD-containing 1A (TR; NM_020946)	Apoptotic	+
	Unknown C2orf33 (FL; NM_020194)	Apoptotic	++
	TBC1 domain family member 10C (TR; NM_198517)	Apoptotic	++
	DDHD domain containing 2 (TR; NM_015214)	Apoptotic	++
	Transmembrane protein 106C (TR; NM_024056)	Apoptotic	+
	Unknown (TR; NM_014855)	Apoptotic	++
	Unknown (TR; NM_025176)	Apoptotic	+
	Hypothetical (TR; XM_930748)	Apoptotic	++

^aIncludes the molecule name as well as the integrity of the clone (FL, full length; TR, truncated) with respect to the indicated RefSeq sequence. ^bR and I denote round or irregular vacuolae, respectively. ^cScale of cell death 36 h post-transfection. (+), below 10% of transfected cells are PI-positive; (++), between 10 and 30% of transfected cells are PI-positive; (+++), more than 30% of transfected cells are PI-positive.

Two vacuolization subcategories were further distinguishable (Table 1). A total of eight clones induced irregular and perinuclear vacuolae (for instance, an homolog of the anterior pharynx defective protein-1, APH1; Figure 2a), whereas four molecules provoked round and evenly distributed ones (for example, the microtubule affinity-regulated kinase-2 (MARK2); Figure 2a). Cytoplasmic vacuolization is frequently observed during nonapoptotic death, and it is sometimes caused by dilation of the endoplasmic reticulum (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002; Broker *et al.*, 2005). Co-transfection with a version of RFP targeted to reticular cisternae (erRFP; Klee and Pimentel-Muñios, 2005) showed that the irregular vacuolae induced by APH1 appeared filled with this marker, thus revealing their reticular origin (Figure 2b). On the contrary, the round vacuolae provoked by MARK2 excluded erRFP (Figure 2b), indicating that both vacuolization processes are, in fact, different.

Detachment from the substrate and ballooned appearance have been associated with autophagic cell death (Shimizu *et al.*, 2004). To evaluate if MYM6 (an unknown Zn-finger-containing protein representative of this morphological type) was able to induce autophagy, we used human LC3A as a reporter system. LC3 translocates to autophagosomes upon their formation while undergoing a concomitant lipid addition that reduces its apparent molecular weight (Mizushima,

2004). Overexpression of MYM6 activated both the re-distribution of LC3A to vesicular structures (Figure 2c, top panel) and a decrease in its molecular weight (Figure 2c, middle panel), in both cases to an extent comparable to NIP, a known pro-autophagic protein (Kanzawa *et al.*, 2005). Electron microscopy studies revealed the proliferation of double-membrane vesicles, an additional feature of autophagy (Figure 2c, bottom panel). Therefore, MYM6 induces autophagy, suggesting that the ballooned morphology caused by its expression is the consequence of autophagic death.

Different modes of cell death are further distinguishable by their variable reliance on the caspase apoptotic machinery (Broker *et al.*, 2005). As expected, death induced by RIP3 was blocked by the pan-caspase inhibitor zVAD.fmk (Figure 2d), whereas both molecules causing vacuolization were partially resistant (Figure 2d) and the autophagic clone showed complete insensitivity (Figure 2d). Therefore, although we have not systematically analysed all clones to evaluate how general is the correlation between the different morphologies and the other parameters evaluated, all these data suggest that we have cloned molecules capable of inducing different types of cell death.

Four of the identified clones are known members of the mitochondrial carrier family (Table 1), a group of proteins involved in metabolite transportation across the inner mitochondrial membrane (Palmieri, 2004).

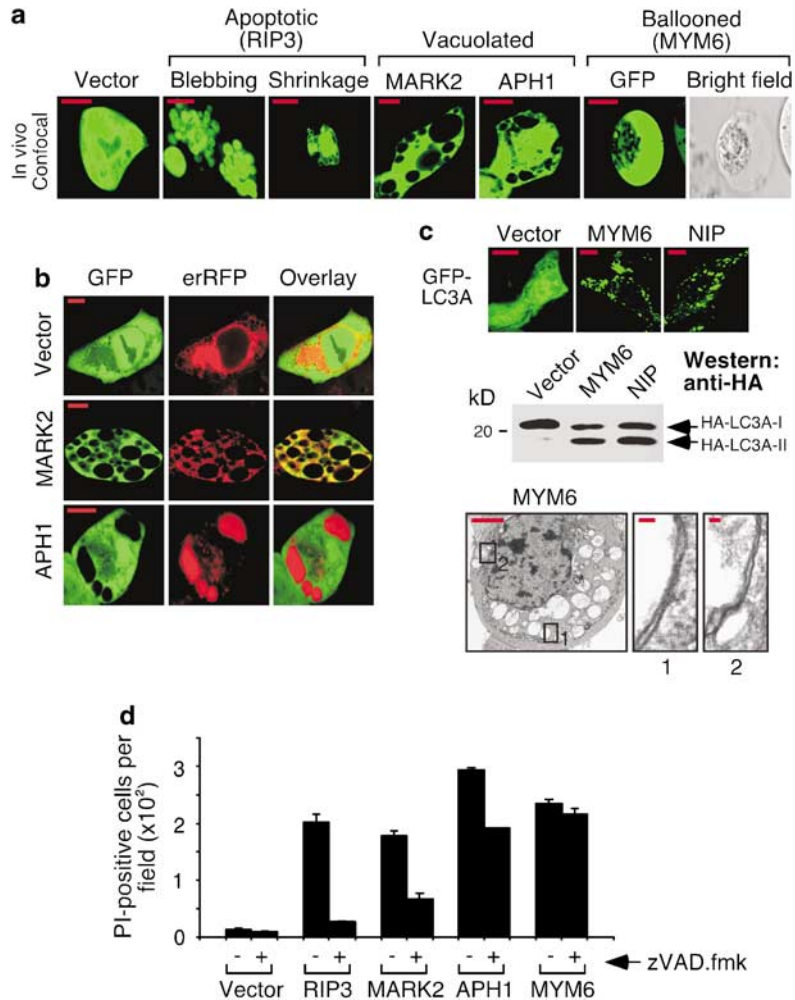


Figure 2 Different types of cell death are represented in the clone collection. (a) Three morphological death types: apoptotic, vacuolated and ballooned. 293T cells were transfected with the indicated molecules mixed with a plasmid expressing GFP, and analysed *in vivo* by confocal microscopy 36 h later. Shown are representative examples. (b) Two vacuolization processes distinguished by their subcellular origin. 293T cells were transfected with the indicated plasmids and analysed 36 h later by *in vivo* confocal microscopy. (c) Expression of MYM6 induces autophagy. 293T cells were transfected with the indicated plasmids, mixed with a plasmid expressing GFP-LC3A (top panel) or HA-LC3A (middle panel), and a plasmid expressing the caspase inhibitor p35 to reduce NIP apoptosis. After 36 h, cells were fixed and analysed by confocal microscopy (top panel), lysed for anti-HA western-blot (middle panel), or fixed for electron microscopy (bottom panel; size bars represent 2 μ m (left) or 40 nm (1 and 2 insets)). (d) Caspase involvement in the different death types. 293T cells were transfected as indicated and treated with zVAD.fmk (50 μ M) 4 h post-transfection. Thirty-six hours later, the number of propidium iodide (PI)-positive cells per field was blindly counted. At least 600 cells were scored for each experimental point. Error bars indicate standard deviations of percentages obtained by counting at least eight different fields.

Two of them, the PiC and the adenine nucleotide transporter 3 (ANT3), show the classical structure with three homology domains (Palmieri, 2004), while the other two, MTCH1 and 2, have only one family domain (Yerushalmi *et al.*, 2002). ANT3 is known to be pro-apoptotic (Zamora *et al.*, 2004). MTCH1 is a mitochondrial pro-apoptotic molecule cloned as a presenilin-1 interactor (Xu *et al.*, 2002). MTCH2 was identified as an mRNA induced by the hepatocyte growth factor (Yerushalmi *et al.*, 2002), and is involved in a protein complex with the apoptotic effectors Bid and Bax (Grinberg *et al.*, 2005). All these carriers were inducers of the classical apoptotic morphology, although MTCH2 provoked some cytoplasmic vacuolization that preceded the appearance of apoptotic signs (Table 1).

ANT, the prototypical member of the carrier family (Palmieri, 2004), is believed to participate in the permeability transition pore complex (PTPC), a mitochondrial assembly also including the outer membrane protein VDAC and matrix cyclophilin D (Zamzami and Kroemer, 2001; Crompton *et al.*, 2002). This pore mediates apoptosis by causing a permeability increase of the inner mitochondrial membrane that results in matrix swelling, outer membrane rupture and release of cytochrome *c* (Brenner and Grimm, 2006). Consistent with the apoptotic function of the PTPC, overexpression of ANT (isoform 1) induces apoptosis (Bauer *et al.*, 1999). Thus, there are both structural and functional characteristics shared by the cloned carriers and ANT, raising the possibility of a similar function in apoptosis.

To test this notion, we first established the ability of the carriers to activate canonical apoptosis. Expression of all molecules in 293T cells induced both the proteolytic processing of the caspase-3 substrate poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP; Figure 3a) and a low molecular weight DNA ladder (Figure 3b), two apoptotic features. Their capacity to activate PARP cleavage was higher than that of ANT2, an inactive member of the family (Figure 3a; Bauer *et al.*, 1999). This pro-death activity was reproduced in other cell lines (Figure 3c). Some of these results confirm previous studies ascribing an apoptotic potential to MTCH1 and ANT3 (Xu *et al.*, 2002; Zamora *et al.*, 2004).

To investigate the signaling pathway involved, we co-transfected the molecules with known inhibitors of apoptosis. Both a dominant-negative version of caspase-9 and the caspase inhibitor p35 blocked PARP processing induced by carrier expression (Figure 4a). This result points to the implication of caspase-9, the main protease activated by cytochrome *c* release (Green and Reed, 1998). Consistent with this, transfection of all clones provoked the liberation of cytochrome *c* from mitochondrial stores (Figure 4b). Antiapoptotic members of the BCL-2 family are known to protect cells from apoptosis induced by a variety of stimuli, including expression of the PTPC component ANT1 (Schubert and Grimm, 2004). Coexpression of the carriers with BCL-XL, a protective BCL-2 homolog (Green and

Reed, 1998), inhibited PARP processing, with the most pronounced effect in the cases of PiC and MTCH2 (Figure 4c). These results show that the cloned mitochondrial carriers induce apoptosis in a manner reminiscent of PTPC components, suggesting a possible participation in the pore.

To explore this idea, we turned to coimmunoprecipitation experiments. Large amounts of transfected PiC and ANT3 could be detected in HA-ANT1 immunoprecipitates (Figure 5a), whereas MTCH2 and MTCH1 were undetectable (Figure 5a). Similarly, HA-VDAC1 immunoprecipitates contained PiC and ANT3, although the highest signal was present in the MTCH2 lane (Figure 5b). Again, MTCH1 was barely detectable (Figure 5b). Therefore, both PiC and ANT3 can associate with ANT1 and VDAC1, whereas MTCH2 shows the ability to bind VDAC1. Complexes were strikingly stable, as they were resistant to washes in high salt conditions.

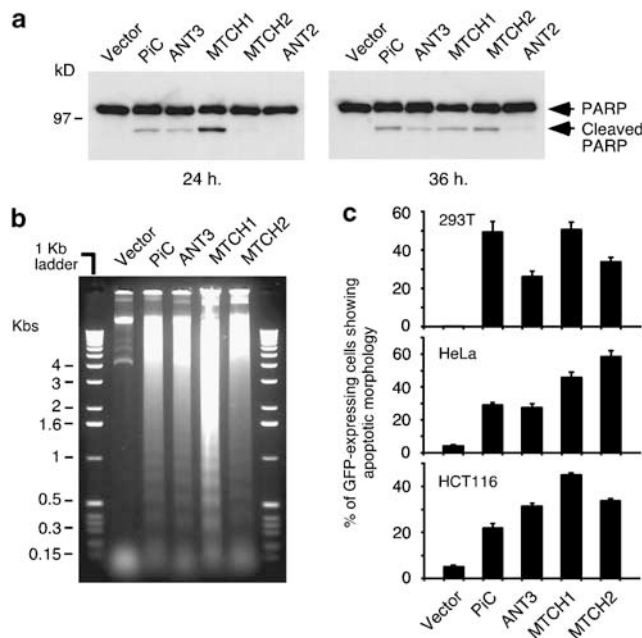


Figure 3 Expression of the mitochondrial carriers activates apoptosis. (a) Induction of PARP processing. 293T cells were transfected with the shown plasmids, lysed at the indicated times and subjected to anti-PARP immunoblotting. (b) Induction of a low-molecular-weight DNA ladder. Cells were transfected as in (a) and lysed 36 h later. DNA was resolved in a 1% agarose gel. (c) Susceptibility of different cell types to apoptosis induced by the carriers. Cells were transfected with the indicated plasmids mixed with a plasmid expressing GFP. Thirty-six hours later, the proportion of GFP-expressing cells showing apoptotic signs was determined *in vivo*. Counts and statistics were performed as in Figure 2d.

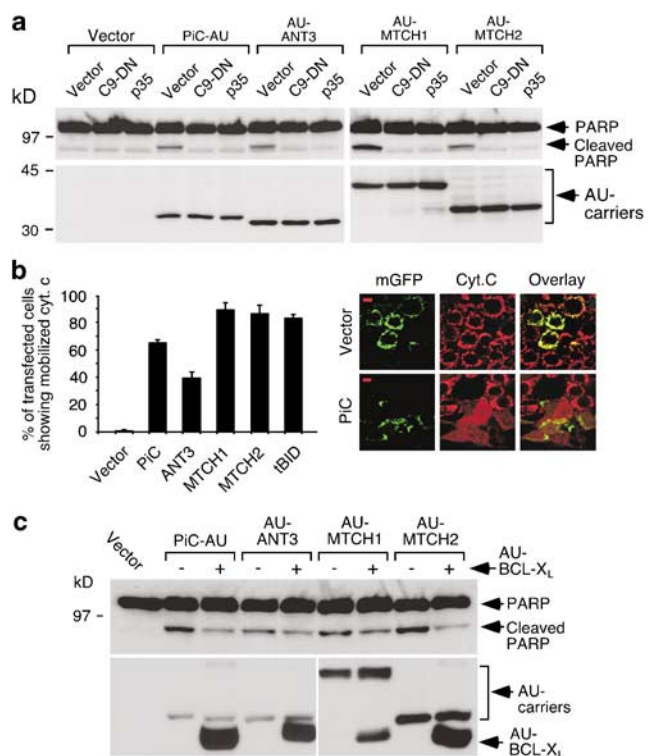


Figure 4 Carrier expression activates the mitochondrial apoptotic pathway. (a) PARP processing is blocked by dominant-negative caspase-9 and p35. 293T cells were transfected with the indicated constructs. Thirty-six hours later, cells were subjected to anti-PARP (top panels) or anti-AU (bottom panels) immunoblots. (b) Induction of cytochrome *c* release. 293T cells were transfected with the indicated constructs mixed with plasmids expressing mitochondrial green fluorescent protein (mGFP) and p35, and stained for cytochrome *c* 36 h later. The percentage of transfected cells showing cytochrome *c* exit was determined by counting mGFP-expressing cells with diffuse cytochrome *c* (red) signal (left panel). Counts and statistics were performed as in Figure 2d. A confocal picture of the signal provided by PiC is shown (right panel). (c) PARP processing is inhibited by BCL-XL. 293T cells were transfected with the indicated constructs and processed as in (a). Anti-PARP (top panel) or anti-AU (bottom panel) immunoblots are shown. AU blots containing PiC and ANT3, or MTCH1 and 2 were run in different percentage gels to maximize resolution with AU-BCL-XL.

These data prompted us to consider a regulatory role in apoptotic pathways of the carriers involved in these contacts. Since an apoptotic function for ANT3 had already been investigated (Zamora *et al.*, 2004), we focused on PiC and MTCH2. We first tested if their interaction with PTPC components increases in response to apoptotic inducers. Preliminary experiments indicated that staurosporine (STS), a well-known apoptotic stimulus, induced marginal cytochrome *c* release in 293T cells, while HeLa cells responded strongly (not shown). In light of this, we chose the latter for this assay. Exposure of HeLa cells to STS provoked an early increase in the amount of transfected PiC coprecipitating with either transfected ANT1 (Figure 6a) or endogenous ANT (Figure 6b). No increased binding of PiC or MTCH2 to VDAC1 was seen in similar conditions (not shown).

These results suggest that PiC incorporates to the PTPC during the onset of STS-induced apoptosis. To explore a possible function in cytochrome *c* exit, we performed knock-down assays using small interfering RNAs (siRNAs). Silencing of PiC resulted in a decreased fraction of cells showing cytochrome *c* mobilization after STS treatment (Figure 7a), an effect reproduced by different PiC siRNA species (Figure 7b). Reduced levels of the established mediator ANT1 rendered a

similar protection (Figure 7a), while MTCH2 diminution provided almost no resistance (Figure 7a). PiC depletion had no gross impact on mitochondrial function since mitochondria kept their ability to incorporate mitotracker, a polarisation-sensitive dye (Figure 7c). Reduced PiC expression also inhibited other STS-induced apoptotic parameters like chromatin condensation (Figure 7d) or caspase activation (Figure 7e).

Discussion

Results shown here indicate that the pro-apoptotic activity of overexpressed PiC reflects a physiological function in apoptotic pathways. Evidence presented proves that this carrier has an active role in regulating the liberation of cytochrome *c* from mitochondria, perhaps through a direct intervention in the PTPC.

Although there is an ongoing controversy regarding the universality of mitochondrial permeability transition (mPT) as the main mechanism for cytochrome *c* release (Garrido *et al.*, 2006), abundant pharmacological evidence links both phenomena in a number of systems (Zamzami and Kroemer, 2001). It is believed that a pore minimally built by ANT, VDAC and cyclophilin D mediates mPT (Zamzami and Kroemer, 2001; Crompton *et al.*, 2002). However, some contradicting results point

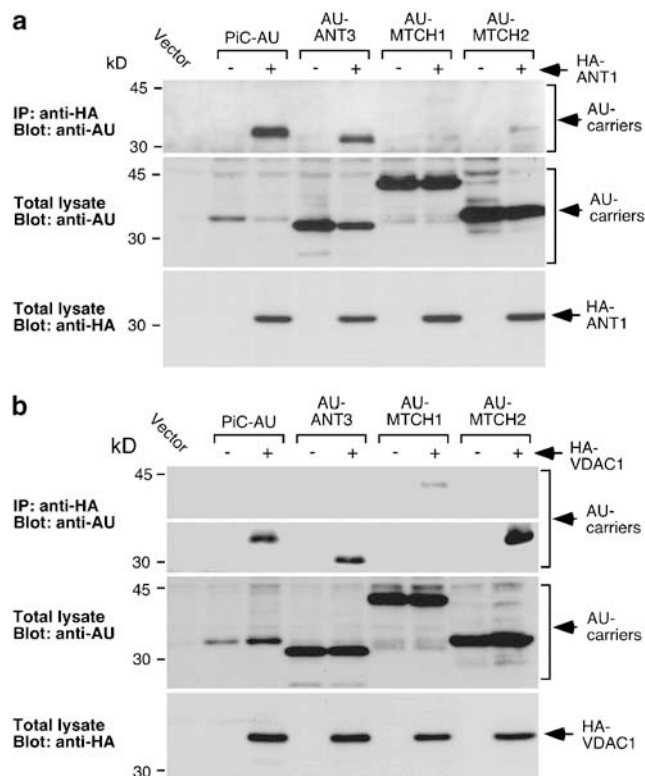


Figure 5 Interaction of the carriers with ANT1 and VDAC1. (a) Coimmunoprecipitation of AU-tagged carriers with HA-ANT1. 293T cells were transfected with the indicated constructs mixed with a plasmid expressing p35 and subjected to anti-HA immunoprecipitation 36 h later. Immunoprecipitates were blotted with an anti-AU antibody (top panel), and total lysates with anti-AU (middle panel) or anti-HA (bottom panel) antibodies. (b) Coimmunoprecipitation with HA-VDAC1. Cells were processed as in (a). The immunoprecipitation gel was horizontally divided to remove irrelevant signal.

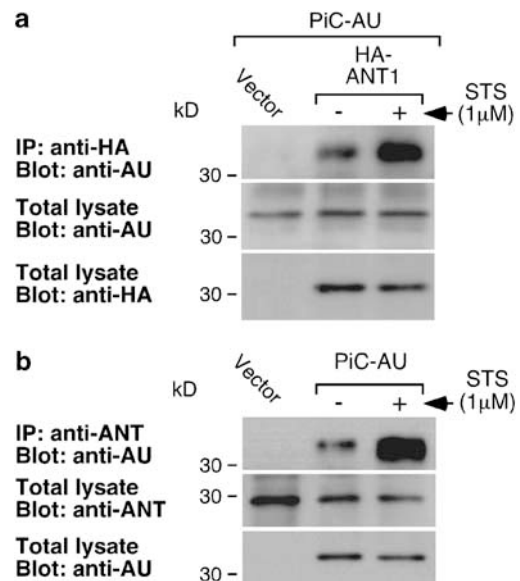


Figure 6 Staurosporine (STS) treatment potentiates the interaction between PiC and ANT. (a) Increased coimmunoprecipitation between transfected PiC and ANT1. HeLa cells were transfected with the indicated constructs and a plasmid expressing p35. After 36 h, cells were treated with STS (1 μ M) for 1 h and subjected to anti-HA immunoprecipitation. Anti-AU western blots of the immunoprecipitates (top panel) are shown. Total lysates were subjected to anti-AU and anti-HA immunoblotting (bottom panels). (b) Increased coimmunoprecipitation between endogenous ANT and transduced PiC. HeLa cells were retrovirally transduced with a mixture of viral supernatants carrying PiC-AU and p35, treated as in (a) and subjected to anti-ANT immunoprecipitation. Anti-AU western blots of the immunoprecipitates (top panel) are shown. Total lysates were subjected to anti-ANT and anti-AU immunoblotting (bottom panels).

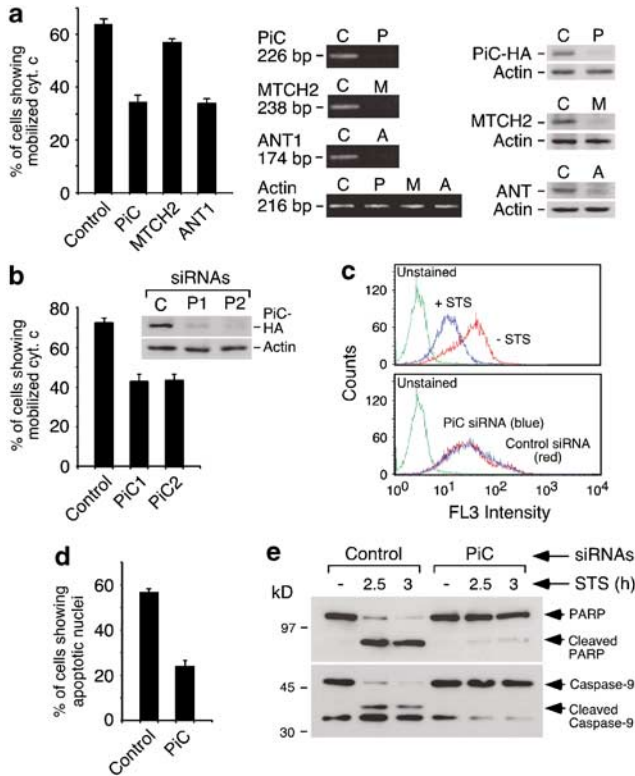


Figure 7 PiC involvement in STS-induced cytochrome *c* release and apoptosis. **(a)** PiC depletion reduces cytochrome *c* release induced by STS. HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs, treated 48 h later ($1 \mu\text{M}$ STS, 3 h), stained for cytochrome *c* and counted to establish the percentage of cells showing cytochrome *c* mobilization (left panel). Counts and statistics were as in Figure 2d. Semi-quantitative RT-PCR (middle panel) and western blots (right panel) show specific depletion. C, P, M and A indicate cells transfected with control siRNA, or siRNAs targeting PiC, MTCH2 and ANT1, respectively. Western-blots show endogenous proteins except for PiC. In this case, HeLa cells were retrovirally transduced with PiC-HA 1 week before siRNA transfection. Shown is an anti-HA immunoblot (right panel, top slot). **(b)** Different siRNA species against PiC inhibit STS-induced cytochromec release. HeLa cells were processed as in **(a)**. **(c)** Normal mitochondrial polarization in cells treated with PiC siRNAs. HeLa cells were transfected as in **(a)**, stained with mitotracker 72 h post-transfection and analysed by flow cytometry (bottom panel). As a control, untransfected cells were either treated with STS ($1 \mu\text{M}$, 6 h) or left untreated (top panel). **(d)** Reduced number of apoptotic nuclei induced by STS in PiC-depleted cells. HeLa cells were treated as in **(a)**, stained with 4',6-diamidino 2-phenylindole (DAPI) and counted to establish the percentage of cells exhibiting chromatin condensation. Counts and statistics were performed as in Figure 2d. **(e)** PiC depletion reduces caspase activation induced by STS. HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs, and 48 h later treated for the shown times with STS ($1 \mu\text{M}$) before processing them for PARP and caspase-9 immunoblots.

to a more flexible structure (Zoratti *et al.*, 2005). For example, data relating mPT and apoptosis are strongly based on drugs targeting ANT, suggesting a central role for this carrier (Zamzami and Kroemer, 2001). On the contrary, recent studies indicate that a functional PTPC can assemble in the genetic absence of ANT (Kokoszka *et al.*, 2004), raising the notion that alternative, non-canonical pores may exist (Halestrap, 2004; Zoratti *et al.*, 2005).

Additional data are also compatible with the existence of different PTPCs. For example, the pore shows multiple conductance states, suggesting the involvement of several functional units (Zoratti *et al.*, 2005; Brenner and Grimm, 2006). In addition, ANT1 can be purified as part of multiple mitochondrial subcomplexes whose composition and oligomerization state depend on the metabolic context (Ko *et al.*, 2003; Faustin *et al.*, 2004; Brenner and Grimm, 2006). Also, the pattern of ANT-interacting proteins changes over time during chemotherapy-induced apoptosis (Verrier *et al.*, 2004). Therefore, ANT appears to engage in flexible contact networks that are modulated by both the metabolic status and apoptotic pressure, making it difficult to identify a pore complex with a unique molecular composition (Zoratti *et al.*, 2005; Brenner and Grimm, 2006).

Coincidentally, PiC seems to participate in similar interaction networks doubly involved in metabolic regulation and apoptosis. Thus, this carrier establishes weak contacts with ANT and ATP synthase to form the 'ATP synthasome', a complex that presumably facilitates substrate usage during the metabolic generation of ATP (Ko *et al.*, 2003). Results shown here now indicate that the interaction between PiC and ANT1 is stabilized under apoptotic pressure, suggesting an induced transition to a 'death mode' that might reflect a participation in the PTPC. Further evidence is consistent with this involvement. For example, the pore shows Pi dependency in some systems (Zoratti *et al.*, 2005), pointing to the presence of a Pi-sensitive subunit. In addition, PiC (like other carriers) can form channels in planar bilayers (Zoratti *et al.*, 2005), and our data also reveal both the ability of PiC to interact with VDAC1 and its role in cytochrome *c* release. Although obviously more studies are needed to formally demonstrate that PiC can contribute to the PTPC and mPT, all these data argue that this is a plausible notion. In fact, a possible role for PiC in a non-canonical pore that explains how mPT occurs in the absence of ANT has already been proposed (Halestrap, 2004; Zoratti *et al.*, 2005). Also supporting a function in apoptosis, PiC has recently been described as a target of the anti-apoptotic protein vMIA (Poncet *et al.*, 2006).

ANT-devoid mitochondria require higher calcium levels to trigger permeability changes (Kokoszka *et al.*, 2004). Thus, although not essential, ANT likely regulates mPT and cytochrome *c* exit, a view now reinforced by our siRNA results (see Figure 7a). Data in the same figure also ascribe a partial role to PiC in cytochrome *c* release. In fact, drugs inhibiting particular pore components often yield incomplete cell death protection (Zoratti *et al.*, 2005; Brenner and Grimm, 2006). These recurrent partial contributions might be explained by the involvement of different pore entities simultaneously cooperating to induce mPT. This view could also help understand why we have identified other mitochondrial carriers in our screening. Thus, both the pro-apoptotic activity of ANT3, MTCH1 and MTCH2 as well as their variable ability to interact with PTPC components might simply reflect a potential to build a

variety of functional pores. Again, more studies are needed to sustain this idea.

In summary, through the use of our cloning system, we have expanded to other members of the carrier family a function believed to be restricted to specific molecules. These results suggest that a common property of a number of mitochondrial transporters was exploited during evolution to regulate apoptosis, and further support the notion that mitochondria are central to the control of apoptotic death. Finally, our screening protocol has produced a wide collection of molecules capable of inducing both apoptotic and atypical death processes. We anticipate that a close scrutiny of these clones will help us gather more insight into the molecular mechanisms that govern both death modalities.

Materials and methods

Cell lines and reagents

293T, HeLa and HCT116 cells (ATCC) were cultured at 37°C and a humidified 5% CO₂ atmosphere, in DMEM plus 10% FBS and 100 U/ml of penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). zVAD.fmk was from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). STS and PI were from Sigma (St Louis, MO, USA).

Screening methods

Bacterial clones of a cDNA expression library from activated human T cells (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA) were picked and pooled using the QpixII robot (Genetix, Hampshire, UK). Plasmid DNA was obtained using a Qiagen Biorobot-3000. Transfections were performed with the calcium phosphate precipitation method. Transfected cultures were scored *in vivo* using an inverted fluorescence microscope.

DNA constructs, transfections and retroviral transductions

cDNAs were N-terminally tagged by PCR, with the exception of PiC (C terminus). Truncated MTCH1 was completed by amplification of the missing 5' part from a cDNA library. VDAC1, NIP and ANT2 cDNAs were screening clones. ANT2 was a weak inducer that did not provoke PI intake (see results). Human LC3A (NM_032514) and ANT1 (NM_001151) cDNAs were amplified from a cDNA library. All cDNAs were sequenced and cloned into the pEAK expression plasmid (Edge Biosystems). Mitochondrial GFP (mGFP) was built by fusing the mitochondrial localization sequence of the ornithine transcarbamylase (a gift from Dr Ute Moll) at the N terminus of GFP. Other constructs were described elsewhere (Pimentel-Muñoz and Seed, 1999; Klee and Pimentel-Muñoz, 2005).

293T cells were transfected with the calcium phosphate precipitation method; HeLa and HCT116 with Fugene (Roche, Mannheim, Germany) and JetPEI (Polyplus, Illkirch, France) respectively. Retroviral transductions were carried out using the vector P12-MMP (a gift from Dr F Radow), a derivative of the pMMP vector (Dr R Mulligan). Virus-containing supernatants were generated by cotransfecting 293T cells with the P12-MMP construct and plasmids expressing the gag-pol (pMD.gag-pol) and envelope (VSV-G; pMD-G) helper activities. Infections were carried out in the presence of polybrene (8 µg/ml, Sigma).

Western blotting

Cell lysis and immunoblotting were performed as described (Klee and Pimentel-Muñoz, 2005). Membranes were probed with antibodies against PARP (Becton Dickinson), caspase-9 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), MTCH2 (Ab3, a gift from Dr A Gross), actin (Sigma), ANT (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), AU1 or HA (Covance, Princeton, NJ, USA).

Death assays

The formation of an apoptotic DNA ladder was assayed as described (Pimentel-Muñoz and Seed, 1999). For the evaluation of membrane integrity, cultures were treated with PI (1 µg/ml) and scored *in vivo* for nuclear staining using an inverted fluorescence microscope. Chromatin condensation was revealed by DAPI staining (1 µg/ml). To measure mitochondrial polarization, cells were stained with Mitotracker (100 nM; Molecular Probes) and analysed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson).

Immunofluorescence

Cells were seeded onto poly-L-lysine (Sigma)-treated coverslips, stained with an anti-cytochrome *c* antibody (Becton Dickinson) and mounted as described (Klee and Pimentel-Muñoz, 2005). For confocal studies, we used the 488- and/or 543-nm bands of a Zeiss LSM-510 microscope. *In vivo* confocal microscopy was performed as described (Klee and Pimentel-Muñoz, 2005). Scale bars represent 10 µm unless otherwise indicated (electron microscopy).

Electron microscopy

Transfected cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde followed by 1% osmium tetroxide containing 0.8% potassium ferricyanide. After dehydration, ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEM-1010 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Coimmunoprecipitation

Cells were lysed as described above (western blotting). After taking a sample as total lysate, post-nuclei supernatants were precleared with 15 µl of packed Sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Immunoprecipitations were performed for 1 h (293T) or 3 h (HeLa) using 10 µl of agarose beads coupled to an anti-HA mAb (Roche), or for 3 h with 3 µg of an anti-ANT antibody (Santa Cruz) followed by a 1 h incubation with 15 µl of packed Sepharose beads coupled to protein G (GE Healthcare). Beads were washed five times with lysis buffer containing 0.9 M NaCl (293T) or lysis buffer (HeLa) and resuspended in sample buffer. Equal volumes were then subjected to anti-AU1 immunoblotting.

siRNA studies

HeLa cells were transfected with predesigned pools of RNA duplexes (On-TargetPlus, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) using DharmaFECT1 (Dharmacon), according to product instructions. Individual siRNAs targeting PiC were also from Dharmacon and their sequences were: PiC1: ggcauuuuuuaacg gauucuu; PiC2: gccaacacuuugagggauguu. For semiquantitative PCR, cDNA was generated using the SuperscriptII kit (Invitrogen). PCR conditions were: 95°C, 1'; 66°C, 1'; 72°C, 1'; for 22 (PiC), 24 (MTCH2), 26 (ANT1) or 21 (Actin) cycles. Oligonucleotides were: PiC: fw, tgcttctctggtcctcaagagact, rev, cagattcagtcacatttgcttgg; ANT1: fw, gcttgagcttctaaggacttc, rev, agggattctcaccacacaatcaat; MTCH2: fw, ggtgaggagtttagga cctggaat, rev, cgaaaaatcctagaatgcctctt; Actin: fw, agatcaagat cattgctcctctg, rev, cttgtttctgcgcaagtttaggtt.

Abbreviations

PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PI, propidium iodide; STS, staurosporine.

Acknowledgements

We thank Dr Brian Seed, in whose laboratory this work was initiated, Dr Atan Gross for the Ab3 anti-MTCH2 antibody, Dr Richard Mulligan for the pMMP, pMD-G and pMD-gag-pol vectors, Dr Felix Randow for P12-MMP, Dr Ute Moll for

the LF-OTC-flag construct and CIC members for support. This work was funded by Grants SAF2002-00193, SAF2005-01208 and GEN2003-20239-C06-05 from the Spanish MEC. Additional funding came from the FEDER program of the European Union. SA, MK and JF hold predoctoral fellowships from the Junta de Castilla y León (SA) or the FPU program of the Spanish Government (MK and JF). AF holds a long-term EMBO postdoctoral fellowship. FXP is an investigator affiliated to the University of Salamanca and funded by the Ramón y Cajal program (Spanish Government).

References

- Albayrak T, Grimm S. (2003). A high-throughput screen for single gene activities: isolation of apoptosis inducers. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 772–776.
- Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. (1999). Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* **147**: 1493–1502.
- Brenner C, Grimm S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* **25**: 4744–4756.
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**: 3155–3162.
- Chanda SK, White S, Orth AP, Reisdorph R, Miraglia L, Thomas RS *et al.* (2003). Genome-scale functional profiling of the mammalian AP-1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12153–12158.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* **84**: 143–152.
- Faustin B, Rossignol R, Rocher C, Benard G, Malgat M, Letellier T. (2004). Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases. *J Biol Chem* **279**: 20411–20421.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**: 1423–1433.
- Green DR, Reed JC. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309–1312.
- Grimm S. (2004). The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. *Nat Rev Genet* **5**: 179–189.
- Grinberg M, Schwarz M, Zaltsman Y, Eini T, Niv H, Pietrokovski S *et al.* (2005). Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* **25**: 4579–4590.
- Halestrap AP. (2004). Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature* **430**: 1p following 983.
- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* **157**: 455–468.
- Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* **24**: 980–991.
- Kiss-Toth E, Qwarnstrom EE, Dower SK. (2004). Hunting for genes by functional screens. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**: 97–102.
- Klee M, Pimentel-Muñoz FX. (2005). Bcl-X(L) specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **168**: 723–734.
- Ko YH, Delannoy M, Hullihen J, Chiu W, Pedersen PL. (2003). Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* **278**: 12305–12309.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP *et al.* (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**: 461–465.
- Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y *et al.* (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**: 3307–3318.
- Mizushima N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 2491–2502.
- Palmieri F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* **447**: 689–709.
- Pimentel-Muñoz FX, Seed B. (1999). Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* **11**: 783–793.
- Poncet D, Pauleau AL, Szabadkai G, Voza A, Scholz SR, Le Bras M *et al.* (2006). Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol* **174**: 985–996.
- Schobel S, Neumann S, Seed B, Lichtenthaler SF. (2006). Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci* **24**: 141–148.
- Schubert A, Grimm S. (2004). Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor. *Cancer Res* **64**: 85–93.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB *et al.* (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**: 1221–1228.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14376–14381.
- Ting A, Lichtenthaler S, Xavier R, Na SY, Rabizadeh S, Holmes T *et al.* (2005). Large-scale screens for cDNAs with in vivo activity. *Novartis Found Symp* **267**: 219–229 discussion 229–230.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**: 214–223.
- Verrier F, Deniaud A, Lebras M, Metivier D, Kroemer G, Mignotte B *et al.* (2004). Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 8049–8064.

- Xu X, Shi YC, Gao W, Mao G, Zhao G, Agrawal S *et al.* (2002). The novel presenilin-1-associated protein is a proapoptotic mitochondrial protein. *J Biol Chem* **277**: 48913–48922.
- Yerushalmi GM, Leibowitz-Amit R, Shaharabany M, Tsarfaty I. (2002). Met-HGF/SF signal transduction induces mimp, a novel mitochondrial carrier homologue, which leads to mitochondrial depolarization. *Neoplasia* **4**: 510–522.
- Zamora M, Granel M, Mampel T, Vinas O. (2004). Adenine nucleotide translocase 3 (ANT-3) overexpression induces apoptosis in cultured cells. *FEBS Lett* **563**: 155–160.
- Zamzami N, Kroemer G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67–71.
- Zoratti M, Szabo I, De Marchi U. (2005). Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta* **1706**: 40–52.