

TESIS DOCTORAL

**Caracterización funcional de la molécula
proapoptótica Bak en el retículo
endoplasmático**

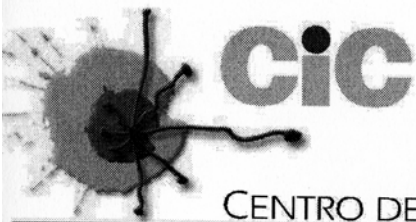
Martina Klee

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



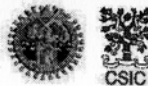
2008





CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca, España
Tel. +34 923 29 47 20
Fax +34 923 29 47 43
www.cicancer.org

Dr. Felipe Xosé Pimentel Muños, Científico Titular del Consejo 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 "**Caracterización funcional de la molécula proapoptótica Bak en el retículo endoplasmático**" presentado por **Dña. Martina Klee**, 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 31 de marzo de 2008.

Fdo.: Dr. Felipe X. Pimentel Muños

VºBº: Dr. Alberto Orfao
Profesor Titular del Departamento de Medicina
Tutor del presente trabajo de doctorado

INTRODUCCIÓN	1
1. LA APOPTOSIS	2
2. LA MAQUINARIA DE APOPTOSIS	3
2.1. "RECEPTORES DE MUERTE" Y SUS LIGANDOS	3
2.2. PROTEÍNAS ADAPTADORAS	3
2.3. LAS CASPASAS	4
2.3.1. Caracterización y estructura	4
2.3.2. Clasificación de las caspasas	5
2.3.3. Activación de caspasas	6
2.3.4. Sustratos de caspasas	6
2.3.5. Inhibidores de caspasas	7
2.4. APAF-1 Y EL APOPTOSOMA	7
2.4.1. Apaf-1	7
2.4.2. La formación del apoptosoma y la activación de caspasa 9	7
2.5. LA FAMILIA BCL-2	8
2.5.1. Clasificación	8
2.5.2. Modelos de interacción entre miembros de la familia Bcl-2	13
2.6. FACTORES APOPTOGENICOS	16
2.6.1. Citocromo c y Smac/DIABLO	16
2.6.2. Mecanismo de liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria	17
3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN APOPTOSIS	17
3.1. VÍAS EXTRÍNECAS	18
3.2. VÍA INTRÍNSECA O VÍA MITOCONDRIAL	18
3.3. DIÁLOGO CRUZADO ENTRE VÍAS EXTRÍNECAS Y VÍAS INTRÍNECAS	18
4. EL PAPEL DEL CALCIO EN APOPTOSIS	19
4.1. EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	19
4.2. LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO	20
4.3. CALCIO Y APOPTOSIS	21
5. LA FAMILIA BCL-2 Y LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS DESDE EL RE	22
5.1. LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO POR LA FAMILIA BCL-2	22
5.2. EL PAPEL DE LA FAMILIA BCL-2 EN APOPTOSIS MEDIADA POR SEÑALES DE CALCIO	23
6. LA FAMILIA BCL-2 Y LA REGULACIÓN DE SEÑALES DE ESTRÉS DEL RE	26
6.1. ESTRÉS DEL RE	26
6.2. LA RESPUESTA A PROTEÍNAS DESPLEGADAS (UPR)	26
6.2.1. Cascada de señalización de IRE1	27
6.2.2. Cascada de señalización de PERK	27
6.2.3. Cascada de señalización de ATF6	27
6.2.4. Degradación asociada al RE	27
6.3. LA IMPLICACIÓN DE LA FAMILIA BCL-2 EN LA UPR	28
6.4. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ESTRÉS DEL RE	29
6.4.1. Vías mediadas por componentes de la UPR	29
6.4.1.1. La vía de IRE1/TRAF2/ASK/JNK	30
6.4.1.2. CHOP/GADD153	30
6.4.1.3. GADD34	31
6.4.1.4. TRB3	31
6.4.2. Vías mediadas por la familia Bcl-2	31
6.4.3. Otros	32
6.4.4. Activación de caspasas durante la apoptosis inducida por estrés del RE	32
6.4.4.1. La caspasa 12	33
6.4.4.2. La caspasa 8	33
6.4.4.3. La caspasa 2	33
6.4.4.4. La procaspasa 8L y Bap31	34

OBJETIVOS..... 36

RESULTADOS 38

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA NUEVA ACTIVIDAD DE BAK AUSENTE EN EL HOMÓLOGO BAX.....39

1.1. IDENTIFICACIÓN DE UN FENOTIPO DE VACUOLIZACIÓN CELULAR CITO-PLASMÁTICA INDUCIDO POR LA COEXPRESIÓN DE BAK Y BCL-X_L39

1.1.1. Experimentos de tiempo-respuesta y cuantificación del porcentaje de células que mostraban el citoplasma vacuolizado41

1.1.2. Determinación del fenotipo de vacuolización en varias líneas celulares.....41

1.2. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA MAQUINARIA EJECUTORA DE APOPTOSIS (CASPASAS) Y LA INHIBICIÓN DE MUERTE CELULAR EN LA GENERACIÓN DEL FENOTIPO42

1.2.1. El bloqueo de la apoptosis inducida por Bak mediante inhibidores alternativos a Bcl-X_L no es suficiente para revelar la vacuolización42

1.2.2. El fenotipo de vacuolización causado por Bak y Bcl-X_L es independiente de la actividad caspasa43

1.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE BAK IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE LA VACUOLIZACIÓN.....44

1.3.1. Una versión de Bak carente del dominio BH3 retiene la capacidad de inducir el fenotipo de vacuolización en ausencia de Bcl-X_L44

1.3.2. Un mutante de Bak carente de los dominios BH3 y BH1 es incapaz de provocar el fenotipo de vacuolización45

1.4. ESTUDIO DEL ORIGEN SUBCELULAR DE LA VACUOLIZACIÓN45

1.4.1. Construcción de RFP reticular como marcador genético del RE45

1.4.2. La vacuolización citoplasmática es RE dilatado45

1.5. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE BAK CAUSANTE DE LA VACUOLIZACIÓN46

1.5.1. Las moléculas inductoras del fenotipo están localizadas físicamente en los márgenes de las vacuolas46

1.5.2. La subpoblación de Bak en el RE retiene la capacidad de provocar la vacuolización47

1.6. RELEVANCIA DEL CALCIO EN LA INDUCCIÓN DEL FENOTIPO49

1.6.1. Implicación de los canales de calcio RyR en la generación de las vacuolas49

1.6.2. Comparación de los niveles de calcio del RE dilatado frente a RE normal.....50

1.7. IDENTIFICACIÓN DE ACTIVADORES DE BAK CAPACES DE INICIAR EL FENOTIPO52

1.7.1. Las proteínas BH3-only Bim_{EL} y tBid inducen vacuolas citoplasmáticas52

1.7.2. La vacuolización causada por Bim_{EL} y tBid es de origen reticular52

1.8. PAPEL DE BAK ENDÓGENO EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL53

1.8.1. Bim_{EL} y tBid inducen la dilatación del RE en células MEF-bax^{-/-}, pero no en células MEF-bak^{-/-}53

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA54

2.1. GENERACIÓN DE UN SISTEMA MODELO APROPIADO PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR.....55

2.1.1. Construcción de una versión completa de Bak con localización subcelular restringida al RE.....55

2.1.2. Generación de una línea celular murina estable que expresa exclusivamente Bak reticular (MEF-DKO-AU1-Bakcb5).55

2.1.3. Validación del modelo de células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 mediante estudios de inducción de muerte celular por proteínas BH3-only56

2.1.4. Expresión específica de Bakcb5 en el RE57

2.1.5. Determinación de la concentración de calcio del RE de los clones #2 y #6 de MEF-DKO-AU1-Bakcb557

2.2. APOPTOSIS MEDIADA POR BAK RETICULAR58

2.2.1. Las proteínas BH3-only Bim_{EL} y Puma, pero no tBid, son capaces de estimular la muerte celular a través de Bak reticular58

2.2.2. La muerte celular inducida por Bim_{EL} y Puma en los clones que expresan Bakcb5 es apoptosis y dependiente de la mitocondria59

2.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE BIM_{EL} Y PUMA Y LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVÉS DE BAK RETICULAR62

2.4. ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN APOPTÓTICA ENTRE EL RE Y LA MITOCONDRIA EN LOS CLONES QUE EXPRESAN BAKCB564

2.4.1. Función del calcio reticular64

2.4.2. Papel de proteínas implicadas en la respuesta celular a estrés reticular en la transmisión de señales apoptóticas a través de Bak reticular68

DISCUSIÓN.....71

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA NUEVA ACTIVIDAD DE BAK AUSENTE EN EL HOMÓLOGO BAX....72

1.1. LA SOBREENEXPRESIÓN COMO ESTRATEGIA PARA EXPLORAR FUNCIONES E INTERACCIONES NUEVAS	72
1.2. BAK NECESITA UN PASO DE ACTIVACIÓN ESPECÍFICO PROPORCIONADO POR BCL-XL	72
1.3. BAK LOCALIZADO EN MEMBRANAS RETICULARES INDUCE LA VACUOLIZACIÓN Y DILATACIÓN DEL RE	73
1.4. IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS BH.....	73
1.5. LA ACTIVIDAD DE BAK PARA PROVOCAR REMODELACIÓN DEL RE NO ES COMPARTIDA POR SU HOMÓLOGO FUNCIONAL BAX	74
1.6. LA REESTRUCTURACIÓN DEL RE COMO CONSECUENCIA DE UNA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR BAK	76
1.7. BASES MOLECULARES DE LA DILATACIÓN RETICULAR	77
1.7.1. La implicación de cambios osmóticos y la contribución del calcio	77
1.7.2. La implicación de la proliferación de la membrana reticular.....	78
1.8. POSIBLES FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACIDAD DE BAK PARA REMODELAR LAS MEMBRANAS RETICULARES.....	78
1.8.1. La contribución a procesos de muerte celular.....	79
1.8.2. La implicación en la vía secretora y la UPR.....	79
1.8.3. El papel de Bak reticular en la fusión de membranas	80
1.8.4. La contribución a la morfogénesis de orgánulos.....	80

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA81

2.1. MOLÉCULAS BH3-ONLY ACTIVAN A BAK RETICULAR PARA INDUCIR APOPTOSIS. ¿PAPEL FACILITADOR DEL RE EN APOPTOSIS O SITIO DE INDUCCIÓN AUTÓNOMO?	81
2.2.1. Bakcb5 reestablece los niveles de calcio en el RE	82
2.2.2. El calcio es necesario pero insuficiente para mediar la respuesta apoptótica inducida por Bak reticular.....	82
2.2.3. Los componentes de la respuesta a estrés reticular IRE1/TRAF2 juegan un papel en la respuesta apoptótica desde el RE	83
2.3.1. Implicación de moléculas relacionadas física o funcionalmente con el RE	84
2.3.1.1. La caspasa 12 y otras caspasas	84
2.3.1.2. Componentes de la vía de señalización dependiente de IRE1 α . La quinasa JNK	85
2.3.1.3 Moléculas que favorecen la interacción entre el RE y la mitocondria	86
2.3.2 Implicación de moléculas que facilitan la movilización del citocromo c al citoplasma	87
2.3.2.1 El papel del PTP.....	87
2.3.2.2 Bak mitocondrial en los clones que expresan Bakcb5	87
2.3.2.3 Bcl-2 como molécula proapoptótica	88

3. CONVERGENCIA DE LAS DOS FUNCIONES DE BAK RETICULAR.....88

CONCLUSIONES 90

MATERIALES Y MÉTODOS 92

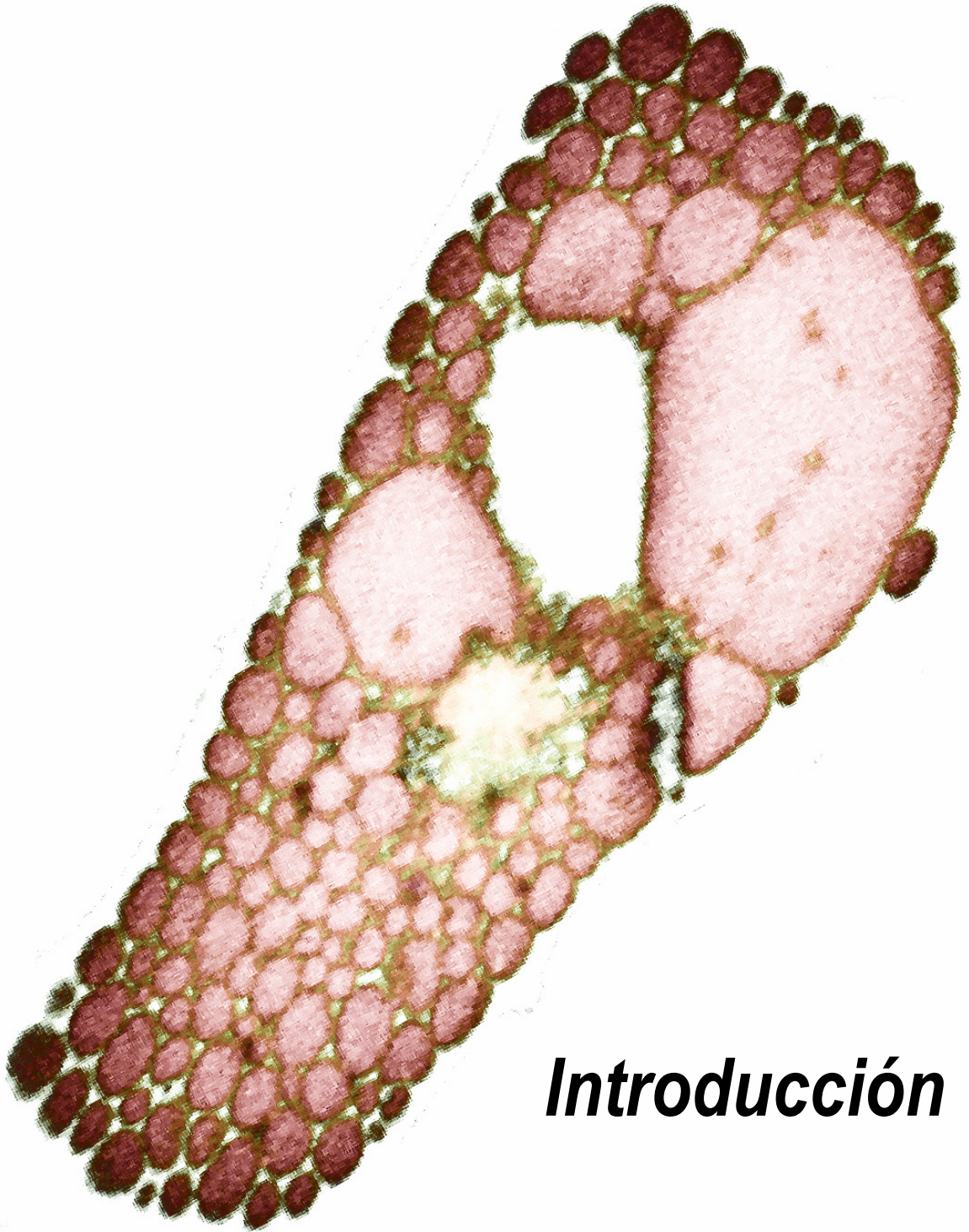
1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR93

1.1. LÍNEAS CELULARES	93
1.2. CULTIVO CELULAR.....	93
1.2.1. Mantenimiento de células.....	93
1.2.2. Congelación celular.....	93
1.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES.....	94
1.3.1. HEK-293T-AU1BclXL-CrmA-p35	94
1.3.2. MEF-DKO-AU1-Bakcb5	95

2. TÉCNICAS DE CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE95

2.1. GENERACIÓN DE FRAGMENTOS PLASMÍDICOS.....	95
2.1.1. Amplificación de ADNc mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	95
2.1.2. Ligación	97
2.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	97
2.3. CULTIVO BACTERIANO Y EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	98

2.3.1. Precultivo líquido	98
2.3.2. Minipreparación de ADN plasmídico por calor	98
2.3.3. Minipreparación de ADN plasmídico por el QIAprep® Spin Miniprep Kit.....	98
2.3.4. Digestión del ADN plasmídico obtenido mediante enzimas de restricción.....	98
2.3.5. Secuenciación	99
2.3.6. Crecimiento bacteriano para maxipreparaciones	99
2.4. PLÁSMIDOS.....	99
3. TÉCNICAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EN CULTIVO	104
3.1. TRANSFECCIONES	104
3.1.1. Método de precipitación con fosfato cálcico	104
3.1.2. Uso del reactivo lipídico FuGENE®6	105
3.2. TÉCNICAS RETROVIRALES	105
3.2.1. Producción de retrovirus	105
3.2.2. Infección de células diana	105
4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	106
4.1. INMUNOFUORESCENCIA.....	106
4.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONTAJES CÉLULARES	107
4.2.1. Cuantificación de células vacuolizadas	107
4.2.2. Cuantificación de células con citocromo c liberado al citoplasma.....	107
4.3. MICROSCOPIA CONFOCAL	107
5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	108
5.1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	108
5.1.1. Obtención y preparación de extractos proteicos	108
5.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	108
5.1.3. Transferencia de proteínas e inmunodetección (western blot).....	108
5.1.4. Anticuerpos	109
5.2. MÉTODOS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	110
5.2.1. Purificación de mitocondrias.....	110
5.2.2. Purificación de microsomas.....	110
6. CITOMETRÍA DE FLUJO Y CUANTIFICACIÓN DE MUERTE CELULAR	111
6.1. INCORPORACIÓN DE IODURO DE PROPIDIO	111
6.2. MARCAJE DE FOSFATIDILSERINA CON ANEXINAV-FITC	112
7. ENSAYOS DE MANIPULACIÓN Y MEDICIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR.....	113
7.1. MEDICIONES DE CALCIO RETICULAR MEDIANTE EL “REPORTERO” GENÉTICO YC3.3.....	113
7.2. MEDICIONES DE CALCIO RETICULAR MEDIANTE EL “REPORTERO” QUÍMICO FURA-2.....	114
7.3. UTILIZACIÓN DE AGENTES MODULADORES DEL CALCIO CELULAR	116
7.3.1. Dantrolina y cafeína	116
7.3.2. TG, C ₂ -ceramida y H ₂ O ₂	116
7.3.3. Bapta-AM y 2-APB	117
8. ARN DE INTERFERENCIA (ARNI).....	117
BIBLIOGRAFÍA	119
ABREVIATURAS.....	144
ANEXO:PUBLICACIÓN	149



Introducción

1. LA APOPTOSIS

La apoptosis es uno de los principales mecanismos de muerte celular programada. Como tal, juega un papel crítico en el desarrollo y la homeostasis tisular (Prindull 1995). Durante el desarrollo, la apoptosis limita la sobreproducción de células, contribuyendo de esta manera a la formación de órganos y tejidos (Meier, Finch et al. 2000). A lo largo de la vida de un organismo, este mecanismo altamente conservado controla el mantenimiento de la homeostasis celular, que es fundamental para la integridad tisular. Asimismo, elimina células que hayan perdido su función, que estén defectuosas o que sean potencialmente peligrosas para el organismo (Strasser, O'Connor et al. 2000).

La apoptosis es un proceso fisiológico y dinámico que está regulado y sostenido en equilibrio de manera muy fina. Si esta regulación se altera, sea por exceso o por defecto, puede dar lugar a varias patologías, de las que se pueden destacar defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (Thompson 1995).

El nombre de apoptosis fue acuñado por Kerr, Wyllie y Currie en el año 1972, utilizando el concepto griego "apó" (desde) y "ptōsis" (caída o colapso de un órgano o parte de él). Kerr diferenció dos tipos de muerte celular a partir de sus morfologías: la necrosis y la apoptosis (Kerr, Wyllie et al. 1972). La apoptosis está definida por los cambios tanto morfológicos como bioquímicos que acompañan el proceso de muerte (Strasser, O'Connor et al. 2000). Al nivel morfológico destaca una serie de características como la reducción del tamaño celular, el *blebbing* de la membrana plasmática y la pérdida de adhesión a células vecinas. Las características bioquímicas asociadas con esta muerte natural incluyen la ruptura internucleosomal del ADN que da lugar a una escalera oligonucleosomal de múltiples fragmentos de 180-200bp (Cohen, Sun et al. 1994), la externalización del fosfolípido fosfatidilserina (Martin, Reutelingsperger et al. 1995) y el procesamiento proteolítico de una serie de sustratos intracelulares (Martin and Green 1995). Como consecuencia de estos cambios en la membrana plasmática, las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por macrófagos o células vecinas (Savill and Fadok 2000). En cambio, en una situación aguda, como tras infecciones, traumas, isquemia o tóxicos, las células sufren el proceso de muerte celular por necrosis, que ocasiona la pérdida de la integridad de la membrana, el hinchamiento celular y la ruptura de la membrana plasmática. En contraposición con la apoptosis, el contenido celular es liberado al exterior de la célula de forma descontrolada, lo que conlleva el daño de células vecinas y finalmente una respuesta inflamatoria aguda en el tejido afectado (Leist and Jaattela 2001).

En el año 1982, el descubrimiento y la descripción de los genes encargados del control y la ejecución de apoptosis durante el desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Horvitz, Sternberg et al. 1983) fue determinante para la investigación detallada del proceso de apoptosis en otros organismos. Gracias a la homología existente entre los genes de *C. elegans* (*ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *EGL-1*)

y organismos superiores, se ha establecido el nematodo como modelo referente de los procesos apoptóticos en otros sistemas (Lockshin y Zakeri 2001). A continuación se detallan los componentes de la maquinaria de apoptosis de mamíferos, haciendo alusión, cuando corresponda, a los homólogos de *C. elegans*.

2. LA MAQUINARIA DE APOPTOSIS

2.1. “RECEPTORES DE MUERTE” Y SUS LIGANDOS

Los “receptores de muerte” son proteínas transmembrana situadas en la superficie de la célula que engloban la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, del inglés *tumor necrosis factor receptor*). Miembros destacados son el receptor para TNF de tipo 1 (TNFR1), Fas (o CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5 (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Estos receptores se caracterizan por la presencia de un número variable de dominios extracelulares ricos en cisteínas y un dominio DD (del inglés *death domain*) en la parte intracelular (C-terminal), que es esencial para la inducción de apoptosis.

Los receptores se activan por un grupo de ligandos estructuralmente relacionados entre sí, y que pertenecen a la familia de ligandos de TNF (TNF, el ligando de Fas (FasL, del inglés *Fas-ligand*), el ligando de DR3, y TRAIL/Apo-2L, respectivamente). La mayoría de estos ligandos se sintetizan como trímeros anclados en la membrana y son posteriormente liberados por proteólisis, y su señalización requiere la unión a sus receptores. Esta unión entre el receptor y su ligando es específica, y provoca la agregación del receptor y de los dominios DD intracelulares, generalmente dando lugar a la formación de un complejo de señalización de membrana, denominado DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*). Este complejo provoca la activación de la cascada de caspasas que conduce a la célula a su destrucción. No obstante, y dado que los miembros de la familia TNF tienen funciones pleiotrópicas, DISC puede desencadenar también procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia (Nagata 1997; Strasser, O'Connor et al. 2000).

2.2. PROTEÍNAS ADAPTADORAS

Proteínas adaptadoras, como FADD, TRADD y Apaf-1, forman un puente físico entre los efectores de muerte (las caspasas) y sus reguladores (los “receptores de muerte” o las proteínas de la familia Bcl-2) (Strasser, O'Connor et al. 2000). Esta asociación está característicamente mediada por interacciones entre los dominios DD, DED (dominios efectores de muerte, del inglés *death effector*

domain) y dominios de reclutamiento y activación de caspasas CARD (del inglés *caspase activation and recruitment domain*) (Hofmann, Bucher et al. 1997; Ashkenazi y Dixit 1998).

En el caso de Fas y su ligando FasL, la activación del receptor recluta la proteína adaptadora FADD/MORT1 (del inglés *Fas-associated death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity*) (Ashkenazi y Dixit 1998) mediante dominios DD presentes en ambas moléculas. FADD, a su vez, permite el reclutamiento de la procaspasa 8 a través de los dominios DED, lo que permite la agregación y activación de la caspasa. De modo similar actúan los receptores DR3 y TRAIL, aunque se sabe que la apoptosis mediada por TRAIL también puede suceder en ausencia de FADD (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

En el caso de la señalización a través del receptor TNFR1, otra proteína adaptadora, denominada TRADD (del inglés *TNFR-1 associated DD*), se encarga de interconectar el receptor y FADD.

2.3. LAS CASPASAS

Las caspasas son proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas (proteasas que contienen una cisteína en el centro activo) y consideradas los principales ejecutores de la maquinaria de apoptosis (Martin y Green 1995; Alnemri, Livingston et al. 1996; Kumar y Lavin 1996; Kumar 2007).

El estudio del grupo de estas proteasas fue originado con el clonaje de *ced-3* en *C. elegans* (Ellis y Horvitz 1986). *Ced-3* resultó ser un gen que codifica un homólogo de la enzima convertidora de interleuquina-1- β (ICE, del inglés *interleukin-1beta converting enzyme*) (Yuan, Shaham et al. 1993), conocida desde entonces como caspasa 1. Aunque finalmente se ha clasificado la caspasa 1 como miembro del grupo de caspasas involucradas en procesos de inflamación y no en apoptosis, es la proteína que fundó la familia (Zimmermann, Bonzon et al. 2001).

2.3.1. Caracterización y estructura

Hasta el momento se han identificado 14 caspasas en mamíferos, de las que 11 se corresponden con proteínas humanas. Estas proteínas comparten similitudes tanto en la estructura y secuencia del ADN como en la especificidad del sustrato (Nicholson y Thornberry 1997) (Figura 1). Todas las caspasas son sintetizadas en forma de zimógenos inactivos (o procaspasas), que contienen varios dominios típicos de la familia: (1) Un prodominio N-terminal variable en su secuencia y longitud, (2) una subunidad gree (p20) que contiene la región catalítica, y (3) una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. Todos los dominios están separados entre sí por uno o más residuos de ácido aspártico (Asp). De estos sitios, dos se usan para su activación por proteólisis, dando lugar al enzima activo en forma de tetrámero (Wolf y Green 1999). Una vez activadas, las caspasas reconocen motivos tetrapeptídicos en el extremo C-terminal de sus proteínas dianas (bien otras caspasas o bien otras proteínas), cortándolas en un residuo Asp. Esta

proteólisis es mediada por un residuo de cisteína en el centro activo de la caspasa, de lo que deriva el nombre de las caspasas como cisteinil-aspártato proteasas (Stennicke y Salvesen 1998).

2.3.2. Clasificación de las caspasas

Con base en su filogenia y función, las procaspasas se clasifican en dos grupos diferentes (Zimmermann, Bonzon et al. 2001): 1.) El grupo de caspasas inflamatorias formado por homólogos de ICE (las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14), que está involucrado en procesos de inflamación y que contiene prodominios largos, y 2.) el grupo de las caspasas implicadas en apoptosis, formado por proteínas homólogas a *ced-3*. Estas caspasas apoptóticas se pueden subclassificar en dos tipos según su función en las diversas cascadas de señalización intracelular: Caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio largo que contiene un dominio efector de muerte celular DED, en el caso de las caspasas 8 y 10, ó un dominio de reclutamiento y activación de caspasas CARD, como en el caso de las caspasas 2 y 9. El dominio CARD promueve la interacción con moléculas adaptadoras que regulan su activación (Hofmann, Bucher et al. 1997; Ashkenazi y Dixit 1998). Las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) están caracterizadas por la presencia de un prodominio corto (Figura 1).

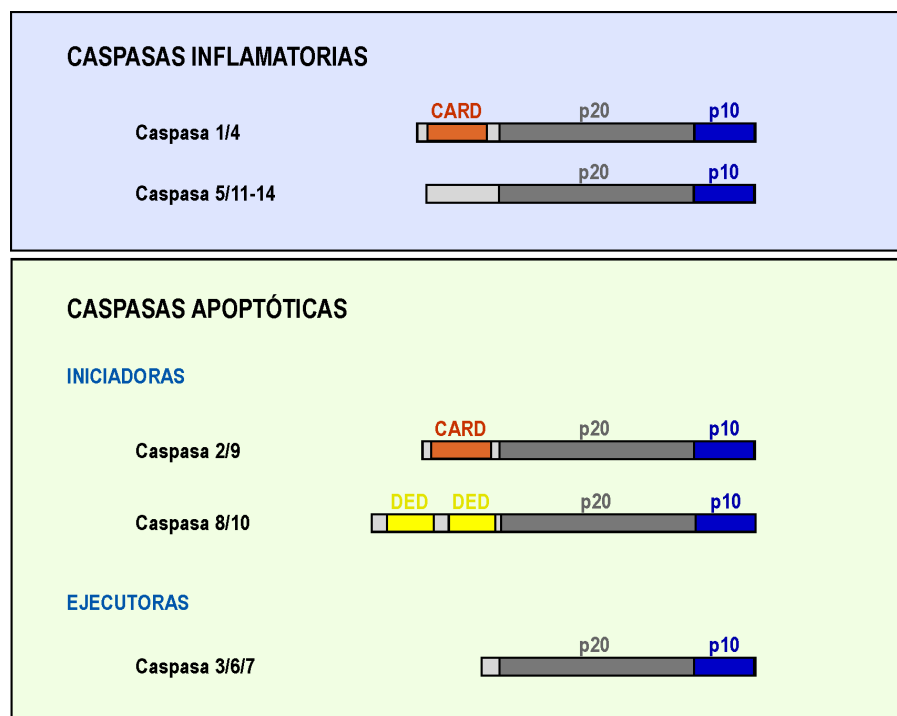


Figura 1. La familia de caspasas (adaptado de Kumar et al., *Cell Death and Differentiation*, 2007).

2.3.3. Activación de caspasas

La activación de las caspasas se realiza de forma eficaz y específica, observándose en todas las células que sufren apoptosis, independientemente de su origen o estímulo (Boatright y Salvesen 2003). Las caspasas iniciadoras y ejecutoras son activadas a través de mecanismos diferentes: La activación de las caspasas iniciadoras (como las caspasas 8 y 9) es facilitada por interacciones entre proteína-proteína, en concreto por su reclutamiento a complejos proteicos (DISC en el caso de caspasa 8, o el apoptosoma en el caso de la caspasa 9) en los que se incrementa la concentración local del zimógeno. Estas condiciones facilitan que la baja e intrínseca actividad proteasa de la procaspasa sea suficiente para la dimerización y autoactivación por proteólisis. Este tipo de activación se ha denominado "Modelo de dimerización inducida por proximidad" (Ashkenazi y Dixit 1998; Boatright, Renatus et al. 2003; Donepudi, Mac Sweeney et al. 2003). Una vez activadas, las caspasas iniciadoras son capaces de cortar y activar a otras caspasas, lo que conlleva la activación de caspasas ejecutoras. Las caspasas ejecutoras (las caspasas 3, 6 y 7) se procesan proteolíticamente en dos sitios Asp (Slee, Harte et al. 1999), tras lo cual desempeñan los pasos de ejecución de apoptosis a través del procesamiento de múltiples sustratos celulares (Degterev, Boyce et al. 2003). Además, las caspasas ejecutoras son habitualmente más abundantes y más activas que las caspasas iniciadoras. De hecho, la más abundante es la caspasa 3, a la que se le reconoce el papel de la caspasa ejecutora crucial y en último término la responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos. El resto de las caspasas efectoras parece jugar papeles facilitadores y redundantes en la mayoría de las vías apoptóticas (Zheng, Hunot et al. 2000). El papel destacado de caspasa 3 viene definido porque la pérdida de caspasa 3 da lugar a malformaciones cerebrales exageradas y muerte prematura. Además, ratones deficientes en esta caspasa son defectuosos en apoptosis en respuesta a estímulos tanto extrínsecos como intrínsecos (Kuida, Zheng et al. 1996; Woo, Hakem et al. 1998).

2.3.4. Sustratos de caspasas

En su conjunto, las caspasas efectoras causan el fenotipo apoptótico mediante el corte o la degradación de una serie de dianas celulares importantes (Timmer y Salvesen 2007). Hasta ahora se han identificado más que 100 sustratos. Con base en su función celular se clasifican en cuatro categorías principales: 1.) Mediadores y reguladores de apoptosis, como por ejemplo las caspasas efectoras, la proteína BH3-*only* Bid (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998) o el sistema de fragmentación de ADN ICAD/DFF45. La inactivación del complejo ICAD/DFF45, mediada por la caspasa 3, permite a la proteína CAD entrar en el núcleo y fragmentar el ADN que origina finalmente la característica "escalera de ADN" que se observa en células apoptóticas (Enari, Sakahira et al. 1998; Sakahira, Enari et al. 1998). 2.) Proteínas estructurales. 3.) Proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN, por ejemplo la

enzima poli-ADP-ribosa polimerasa PARP (del inglés *poly(ADP-ribose) polymerase*). 4.) Proteínas relacionadas con el ciclo celular.

2.3.5. Inhibidores de caspasas

En células normales, la actividad proapoptótica de las caspasas está controlada para garantizar la supervivencia de la célula. Algunos reguladores negativos se han identificado tanto en virus como en humanos (Callus y Vaux 2007). Los primeros inhibidores de caspasas identificados fueron CrmA y p35. CrmA (del inglés *cytokine response modifier A*) proviene del virus de la varicela vacuna y, aunque por su estructura y mecanismo de acción pertenece a los inhibidores de serina-proteasas, tiene capacidad de inhibir el grupo de cisteinil-aspartato proteasas, y entre ellas, sobre todo, las caspasas 1, 8 y 10. P35 es un producto génico de los baculovirus e inhibe un rango más amplio de caspasas que CrmA, en concreto primordialmente las caspasas 1, 3, 6, 8, 7, 10. Aparte de estos inhibidores encontrados en virus, existe una familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP del inglés *inhibitors of apoptosis proteins*) que se ha caracterizado inicialmente como proteínas codificadas por el baculovirus. Sin embargo, esta familia incluye también homólogos en células de mamíferos, que inhiben bien de forma directa o indirecta las caspasas 3, 7 y 9 (Liston, Fong et al. 2003).

2.4. APAF-1 Y EL APOPTOSOMA

2.4.1. Apaf-1

Los estudios genéticos en *C. elegans* situaron *ced-4* en la cascada de señalización apoptótica *upstream* de la caspasa *ced-3*. Más tarde se descubrió que *ced-4* constituía un paso intermedio entre los reguladores de apoptosis y sus ejecutores. Este paso intermedio en células de mamíferos se adscribió inicialmente a tres actividades, denominadas Apaf (del inglés *apoptosis protease activating factor*), que eran necesarias para promover la actividad caspasa a partir de fracciones citosólicas de células. Apaf-1 resultó ser una proteína adaptadora y regulador clave de la vía mitocondrial con homología con *ced-4*, mientras que Apaf-2 fue identificado como citocromo c y Apaf-3 como la caspasa 9 (Li, Nijhawan et al. 1997; Zou, Henzel et al. 1997; Danial y Korsmeyer 2004).

2.4.2. La formación del apoptosoma y la activación de caspasa 9

La formación del complejo multimérico del apoptosoma se desencadena a partir de la liberación del citocromo c de la mitocondria, un proceso que está mediado por los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Riedl y Salvesen 2007). Apaf-1 inactivo presenta su dominio CARD bloqueado internamente por un dominio WD40 de la misma molécula. Una vez liberado el citocromo c, Apaf-1 se une a él mediante

los dominios WD40 de unión proteína-proteína en su parte C-terminal. Esta asociación desocupa el dominio CARD de Apaf-1, previamente secuestrado por sus dominios WD40. Tras la exposición de CARD Apaf-1 se asocia con un dominio similar presente en la caspasa 9 (Li, Nijhawan et al. 1997), provocando así su reclutamiento al complejo. La unión posterior de ATP/dATP a Apaf-1 provoca un cambio conformacional que facilita el ensamblaje del apoptosoma como heptámero en forma de una rueda, conocida como el apoptosoma (Acehan, Jiang et al. 2002). El reclutamiento de caspasa 9 a esta estructura permite su activación mediante “dimerización inducida por proximidad”.

2.5. LA FAMILIA BCL-2

La familia Bcl-2 es un conjunto creciente de proteínas que contiene algunos de los más importantes reguladores de las vías intrínsecas de apoptosis (Danial y Korsmeyer 2004; Youle y Strasser 2008). El nombre de la familia deriva del primer miembro que se identificó, la proteína Bcl-2 (Bakhshi, Jensen et al. 1985; Cleary y Sklar 1985; Tsujimoto, Cossman et al. 1985). Desde entonces se han identificado al menos 20 miembros de esta familia en células de mamíferos. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de al menos un dominio de un total de cuatro regiones conservadas, denominadas “dominios de homología Bcl-2” (BH, del inglés *Bcl-2 homology domains*) que corresponden aproximadamente con las α -hélices de las moléculas.

2.5.1. Clasificación

La familia Bcl-2 comprende miembros pro- y antiapoptóticos, y se divide en tres categorías principales con base en su función y estructura (Figura 2):

(1) Miembros antiapoptóticos (*Subfamilia tipo Bcl-2*)

Esta categoría abarca los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, e incluye a Bcl-2 (Henderson, Rowe et al. 1991), Bcl-X_L (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993), Bcl-w (Gibson, Holmgreen et al. 1996), Mcl-1 (Kozopas, Yang et al. 1993), A1 (Bfl-1) (Choi, Park et al. 1995), Boo (Diva) (Inohara, Gourley et al. 1998; Song, Kuang et al. 1999) y NR-13 (Gillet, Guerin et al. 1995), presentando los 4 dominios de homología (BH1-BH4), con la excepción de Mcl-1 y A1 que carecen del dominio BH4, pero sí presentan actividad antiapoptótica.

(2) Miembros proapoptóticos

Estas proteínas se pueden clasificar en dos subgrupos:

a. Subfamilia “multidominio”

Este grupo comprende los miembros Bax, Bak y Bok (Mtd) y está definido por la presencia de los dominios BH1-3.

b. Subfamilia "BH3-only"

Esta categoría incluye los miembros Bid (Wang, Yin et al. 1996), Bad (Yang, Zha et al. 1995), Bim (Bod) (O'Connor, Strasser et al. 1998), Bik (Nbk) (Boyd, Gallo et al. 1995), Blk (Hegde, Srinivasula et al. 1998), Bmf (Puthalakath, Villunger et al. 2001), Bnip3 (Yasuda, Theodorakis et al. 1998), Hrk (Inohara, Ding et al. 1997), Noxa (Oda, Ohki et al. 2000), Puma (Nakano y Vousden 2001; Yu, Zhang et al. 2001) y Spike (Mund, Gewies et al. 2003), que solamente presentan homología en el dominio mínimo necesario para la muerte celular, la α -hélice BH3.

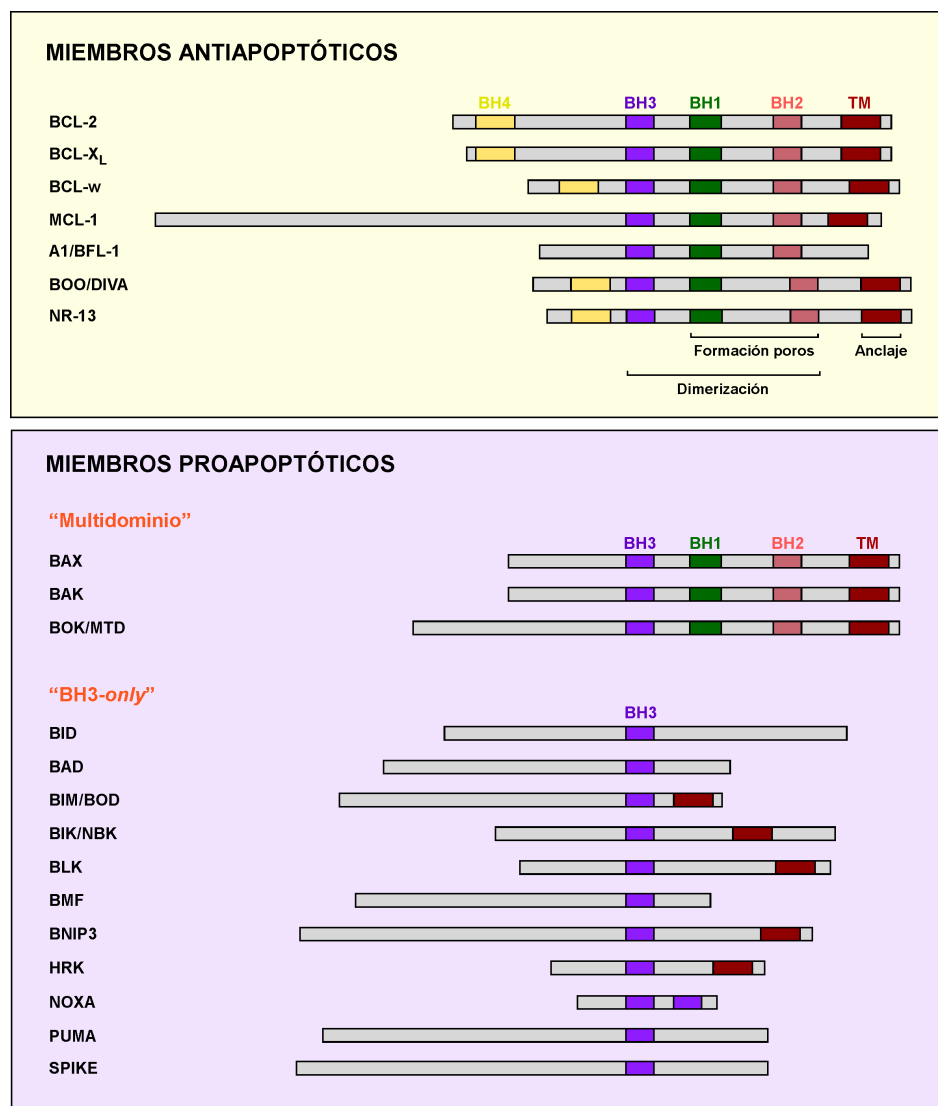


Figura 2. La familia Bcl-2 (adaptado de Walensky, Cell Death and Differentiation, 2006).

La mayoría de los miembros de la familia Bcl-2 tiene la capacidad de dirigirse y anclarse en membranas subcelulares, una característica que viene definida por una secuencia hidrofóbica en el extremo carboxilo (un dominio transmembrana, TM), aunque para una integración completa de las

proteínas probablemente se necesiten elementos adicionales de la molécula (Kim, Annis et al. 2004; Annis, Soucie et al. 2005).

Miembros antiapoptóticos

Bcl-2 se describió inicialmente como protooncogén en el estudio de la translocación recíproca t(14;18) observada en linfomas foliculares de células B, de ahí su nombre (por *B-cell lymphoma 2*). A diferencia de otros oncogenes estudiados hasta ese momento, la expresión de Bcl-2 no promovía la proliferación celular sino el bloqueo de la muerte celular inducida por múltiples estímulos fisiológicos y patológicos. Posteriormente, se descubrió que Bcl-2 era el homólogo del represor apoptótico *ced-9* de *C. elegans*.

Estudios estructurales con Bcl-X_L revelaron que la proximidad espacial de los dominios BH1-BH3 permite su plegamiento en un dominio globular, con un surco hidrofóbico en su superficie. Esta región hidrofóbica puede unir dominios BH3 (que consisten en una hélice anfipática) de miembros proapoptóticos, produciendo así su inhibición (Muchmore, Sattler et al. 1996; Sattler, Liang et al. 1997; Liu, Dai et al. 2003).

Miembros proapoptóticos

Subfamilia “multidominio”

Los miembros de la subfamilia proapoptótica “multidominio” (Bak, Bax y Bok) poseen en los dominios BH1-BH3 alta homología con Bcl-2, pero carecen del dominio BH4 (Suzuki, Youle et al. 2000; Moldoveanu, Liu et al. 2006). Como miembros prototípicos de esta subfamilia se refiere habitualmente a Bak y Bax, cuya expresión es ubicua, mientras que el tercer miembro, Bok (del inglés *Bcl-2-related ovarian killer*), está menos estudiado y su expresión más restringida (Hsu, Kaipia et al. 1997).

El primer homólogo proapoptótico, Bax, fue identificado a través de su interacción con Bcl-2 (Oltvai, Millman et al. 1993), de ahí su nombre (por *Bcl-2-associated X Protein*), mientras que Bak (del inglés *Bcl-2 homologous antagonist killer*) fue clonado por dos grupos diferentes que mostraron que su sobreexpresión induce apoptosis en células de mamíferos (Chittenden, Harrington et al. 1995; Kiefer, Brauer et al. 1995) y en *S. pombe* (Ink, Zornig et al. 1997; Jurgensmeier, Krajewski et al. 1997).

Bak y Bax tienen funciones múltiples y mayoritariamente redundantes. Mientras que la pérdida de sólo uno de los genes tiene poco efecto en la mayoría de las células y los tejidos (aunque para la espermatogénesis en algunas células neuronales se requiere solamente Bax), la ausencia de ambas proteínas bloquea la apoptosis inducida por todos los estímulos de la vía intrínseca de muerte celular en una gran mayoría de tipos celulares (Lindsten, Ross et al. 2000; Wei, Zong et al. 2001), y además impide de forma dramática la retracción que durante el desarrollo embrionario sufren diversos tejidos (Lindsten, Ross et al. 2000), provocando la muerte en el estadio perinatal. Esta resistencia de células dobles deficientes ha llevado a la consideración de que los dos homólogos constituyen un requisito indispensable

para la inducción de apoptosis a través de la mitocondria (Wei, Zong et al. 2001) y el RE (Scorrano, Oakes et al. 2003).

En su estado inactivo, tanto Bak como Bax se encuentran en forma de monómeros, aunque se diferencian a nivel de su localización subcelular. Mientras que Bak es una proteína integral de membranas mitocondriales y reticulares, Bax aparece mayoritariamente citosólica o laxamente anclada con la cara citoplasmática de ambos orgánulos. En respuesta a un estímulo de muerte celular, Bax se transloca a estas membranas, y ambas proteínas sufren un cambio conformacional, que da lugar a su activación (ver detalles más adelante).

Subfamilia proapoptótica BH3-only

En contraposición a la homología que tienen los miembros de la subfamilia de tipo Bax, los miembros BH3-only carecen en gran medida de homología tanto entre sí como con el resto de los miembros de la familia. Su característica común es la presencia de un dominio BH3, el cual es esencial y suficiente para la actividad proapoptótica (Huang y Strasser 2000; Willis y Adams 2005). A continuación se describen con más detalle las moléculas de la subfamilia BH-only Bim, Bid y Puma. Estas proteínas presentan un papel particularmente destacado puesto que, en contraste con el resto de los miembros de este grupo, son capaces de reconocer y unirse a un amplio rango de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, y se cree que esta es la razón por la que son especialmente potentes en la inducción del proceso apoptótico.

La proteína Bim existe en varias formas isoméricas debido a la acción del *splicing* alternativo (Bim_{EL}, Bim_L, Bim_S, Bim α , Bim β), de las cuales una versión corta, Bim_S, y dos largas, Bim_L y Bim_{EL}, son constitutivamente activas (O'Connor, Strasser et al. 1998; U, Miyashita et al. 2001). En células viables, Bim_{EL} y Bim_L son secuestrados por su unión al complejo del motor de dineína, y por tanto son incapaces de promover la muerte celular. Distintos estímulos (la retirada de factores de crecimiento, por ejemplo) inducen su liberación y la translocación a la mitocondria. En cambio, Bim_S no interacciona con este complejo, pero sí es capaz de unirse a proteínas antiapoptóticas (Puthalakath, Huang et al. 1999). Bim tiene varias funciones fisiológicas. Es un regulador importante de la homeostasis de linfocitos y evita así enfermedades autoinmunes (Bouillet, Metcalf et al. 1999). Asimismo, Bim es un requisito para la eliminación de células T (Bouillet, Purton et al. 2002) y B (Enders, Bouillet et al. 2003) autorreactivas, y la desactivación de la respuesta inmune de células T (Hildeman, Zhu et al. 2002; Pellegrini, Belz et al. 2003). Experimentos con células en cultivo han mostrado que Bim es esencial para la apoptosis inducida por algunos estímulos de estrés que dependen de la familia Bcl-2, como la retirada de citoquinas, la exposición a taxol o ionomicina (Bouillet, Metcalf et al. 1999).

La molécula proapoptótica Bid fue aislada sobre la base de su capacidad de unirse tanto a Bax como a Bcl-2 (Wang, Yin et al. 1996). Bid está localizado normalmente en el citosol en su forma inactiva (p22), y es procesado por la caspasa 8 a su forma truncada (p15). Esta proteólisis le convierte en una

molécula proapoptótica activa que se transloca a la mitocondria, ocasionando la activación de Bak y Bax (Korsmeyer, Wei et al. 2000).

La proteína BH3-*only* Puma (del inglés *p53-upregulated modulator of apoptosis*) es una diana transcripcional de p53 y fue clonada inicialmente como gen activado por este supresor de tumores en células que sufrían apoptosis inducida por p53 (Nakano y Vousden 2001; Yu, Zhang et al. 2001), y además fue identificada como proteína capaz de interactuar con Bcl-2 (Han, Flemington et al. 2001). Puma, del que existen diversas formas debido a un *splicing* alternativo (Puma α y Puma β), es un inductor de apoptosis muy efectivo. Su sobreexpresión, por ejemplo, es capaz de matar células cancerosas en pocas horas y estudios en células cancerosas colorrectales deficientes en *puma* muestran que es necesario para la apoptosis inducida por p53, hipoxia y agentes que causan daño en el ADN (Yu, Wang et al. 2003). Ratones deficientes en *puma* son capaces de recapitular la mayoría, si no todas, de las deficiencias apoptóticas observadas en ratones deficientes en *p53* (Jeffers, Parganas et al. 2003; Villunger, Michalak et al. 2003). Por ejemplo, la apoptosis en timocitos inducida por irradiación o agentes que causan daño en el ADN se presenta inhibida en ratones deficientes en *puma* de una manera parecida a ratones deficientes en *p53*. Asimismo, Puma es necesario tanto para la apoptosis dependiente de p53 en respuesta a los oncogenes c-Myc y E1A en células MEF como para la apoptosis inducida por daño en el ADN en neuronas en desarrollo. Además, la carencia de Puma protege linfocitos de estímulos apoptóticos independientes de p53 como son la retirada de citoquinas, la exposición a glucocorticoides (como dexametasona), staurosporina y ésteres de forbol. Aún así, se ha visto que Puma es dispensable para el desarrollo. En células cancerosas colorrectales, se ha podido mostrar que Puma induce apoptosis a través de Bax (Yu, Wang et al. 2003).

Regulación de proteínas BH3-*only*

La gran diversidad estructural que existe entre las proteínas BH3-*only* de mamíferos supone que los diferentes miembros de la familia se regulan de formas variadas incluyendo tanto mecanismos transcripcionales como diversos mecanismos a nivel postraduccional (Lucken-Ardjomande y Martinou 2005; Willis y Adams 2005). Ejemplos de moléculas BH3-*only* reguladas transcripcionalmente son Puma y Noxa. En presencia de estímulos que causan daño genético, la transcripción de Puma y Noxa es regulada positivamente por el factor de transcripción p53 (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano y Vousden 2001; Yu, Zhang et al. 2001). Existen ejemplos variados de regulación postraduccional. Por ejemplo, en respuesta a factores de crecimiento y supervivencia Bad permanece fosforilado, lo que conlleva su secuestro por proteínas 14-3-3. En ausencia de esos factores, Bad es desfosforilado y ello provoca su movilización y la activación de su función apoptótica (Zha, Harada et al. 1996). En cambio, Bim puede estar regulado tanto de forma transcripcional como postraduccional. En células hematopoiéticas, Bim es inducido al nivel transcripcional por FOXO3A (Dijkers, Medema et al. 2000). En otras células, el control de Bim se ejerce, como ya se ha mencionado, desde el citoesqueleto, dado que Bim se une a los microtúbulos a través del

complejo del motor de dineína desde donde responde a estímulos variados (Puthalakath, Huang et al. 1999). En algunos tipos celulares, sin embargo, Bim se une predominantemente a proteínas antiapoptóticas de la mitocondria (Zhu, Swanson et al. 2004; Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006). Bim también puede estar regulado por fosforilación, aunque, dependiendo de la quinasa, esta fosforilación ocasiona la degradación de la proteína por el proteasoma (en el caso de Erk) (Akiyama, Bouillet et al. 2003; Ley, Balmanno et al. 2003; Luciano, Jacquel et al. 2003) o la activación de su actividad proapoptótica (en el caso de c-Jun) (Putcha, Le et al. 2003). En otra modalidad de regulación postraduccional, la activación de Bid requiere su procesamiento proteolítico mediado por la caspasa 8 o la granzima B.

Una vez activadas, las proteínas BH3-*only* insertan la hélice anfipática que forma su dominio BH3 en el surco hidrofóbico de los derivados antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Hinds y Day 2005), bloqueando su actividad protectora y sensibilizando así a la célula para la muerte celular. Tradicionalmente se pensó que las proteínas BH3-*only* se unían a todos los homólogos antiapoptóticos de la familia Bcl-2 de manera indiscriminada, hasta que estudios cuantitativos revelaron diferencias en su afinidad (Chen, Willis et al. 2005; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005). Como ya se ha mencionado anteriormente, Bim, Puma y tBid se unen a todas las proteínas antiapoptóticas y son inductores potentes de muerte celular. Eso les confiere un papel destacado entre los miembros BH3-*only* de la familia. En cambio, las demás moléculas BH3-*only* se asocian preferentemente con una subclase antiapoptótica de modo más selectivo (Chen, Willis et al. 2005). Noxa, por ejemplo, sólo se asocia con Mcl-1 y A1, y Bad sólo con Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w.

Aunque las proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 o Bcl-X_L, juegan un papel importante en la unión y el secuestro de proteínas BH3-*only*, la activación de las moléculas BH3-*only*, sea de forma directa o indirecta, finalmente da lugar a la activación de Bax y Bak. Este orden de señalización es consistente con la vía en *C. elegans*, que sitúa la proteína BH3-*only* EGL-1 en un nivel funcional superior que la molécula protectora *ced-9* (Conradt y Horvitz 1998).

2.5.2. Modelos de interacción entre miembros de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen capacidad de dimerizarse. Esta interacción entre sí es crucial y decisiva para la inducción y ejecución de apoptosis. En la señalización apoptótica, las proteínas BH3-*only* desempeñan la función de “sensores de estrés” que integran de forma selectiva las diversas señales de supervivencia o muerte celular (señales fisiológicas como la reducción de citoquinas, la pérdida de contacto de las células con la matriz extracelular, la señalización por receptores de antígenos, o señales patológicas como el daño genético, los tratamientos con agentes antitumorales o irradiaciones con luz ultravioleta o rayos gamma). Una vez activadas, las proteínas BH3-*only* transmiten estas señales a Bak y Bax y actúan como iniciadores de la vía. De hecho, la activación de estos dos homólogos es un requisito indispensable, dado que proteínas BH3-*only* no son capaces de inducir apoptosis en células carentes de Bak y Bax (Cheng, Wei et al. 2001; Zong, Lindsten et al. 2001). No obstante, todavía se

desconoce el mecanismo exacto que da lugar a dicha activación de Bak y Bax. Hasta el momento se han planteado dos modelos de acción (Adams y Cory 2007) (Figura 3):

(1) El modelo de activación directa

Según este modelo, un subgrupo de proteínas BH3-*only* denominadas “activadoras”, que incluyen Bim, tBid (Letai, Bassik et al. 2002; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005; Oh, Barbuto et al. 2006; Walensky, Pitter et al. 2006) y posiblemente Puma (Cartron, Gallenne et al. 2004; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005; Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006; Kim, Rafiuddin-Shah et al. 2006; Ming, Wang et al. 2006), se uniría mediante su dominio BH3 (triángulo gris) directamente a Bak y Bax para promover así su activación (Letai, Bassik et al. 2002; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005; Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006; Kim, Rafiuddin-Shah et al. 2006; Oh, Barbuto et al. 2006; Walensky, Pitter et al. 2006). En cambio, otro subgrupo constituido por los BH3-*only* restantes (como Bad y Noxa) denominados “sensibilizadores”, solamente actuaría asociándose mediante su dominio BH3 con proteínas antiapoptóticas, liberando de su efecto inhibitorio a una de las moléculas BH3-*only* de tipo “activador” que, posteriormente, se uniría con su dominio BH3 directamente a Bak y Bax (Figura 3a).

(2) El modelo de activación indirecta

En contraposición con el modelo de activación directa, esta teoría afirma que todas las proteínas BH3-*only* únicamente se unirían a los homólogos antiapoptóticos, impidiendo así su acción inhibitoria sobre Bak y Bax (Chen, Willis et al. 2005; Willis, Chen et al. 2005; Uren, Dewson et al. 2007; Willis, Fletcher et al. 2007). En este modelo Bim, tBid y Puma serían las proteínas más potentes, por el solo hecho de poderse unir a un mayor rango de proteínas antiapoptóticas (Chen, Willis et al. 2005) (Figura 3b).

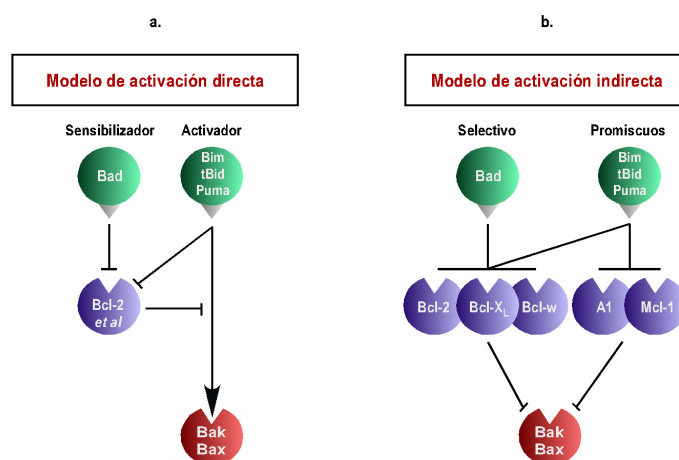


Figura 3. Modelos de activación para Bak y Bax (Adams y Cory, *Current Opinion in Immunology*, 2007).

Varios estudios recientes han aportado evidencias que en conjunto apoyan el modelo de activación indirecta, demostrando precisamente que la apoptosis no requiere la activación directa de Bak o Bax mediante proteínas BH3-*only* (Erlacher, Labi et al. 2006; White 2006; Willis, Fletcher et al. 2007). Sin embargo, a raíz de otros estudios *in vitro* no se puede descartar una activación directa definitiva en algunas circunstancias (Kuwana, Mackey et al. 2002; Kuwana, Bouchier-Hayes et al. 2005; Oh, Barbuto et al. 2006; Walensky, Pitter et al. 2006).

Según el modelo de activación indirecta, la apoptosis sería la vía funcional por defecto, y diferentes miembros antiapoptóticos serían los guardianes de esta actividad proapoptótica, dependiendo la especificidad de unión probablemente del tipo celular. Esta inhibición, al menos la de Bak, por proteínas antiapoptóticas estaría basada en parte en una asociación directa (Willis, Chen et al. 2005; Willis, Fletcher et al. 2007). En células viables, Bak se puede unir a través del dominio BH3 (triángulo gris) (Willis, Chen et al. 2005) a Mcl-1 (Cuconati, Mukherjee et al. 2003) o Bcl-X_L, pero no Bcl-2 (Figura 4a, panel superior). Para la inducción de apoptosis, las proteínas BH3-*only* tienen que desplazar a Bak de estos homólogos antiapoptóticos (Figura 4a, panel inferior), y Bak liberado formaría oligómeros que favorecerían la permeabilización de la membrana mitocondrial y la salida de citocromo c (Figura 4a, panel inferior). De modo similar, se activaría el homólogo Bax (Figura 4b).

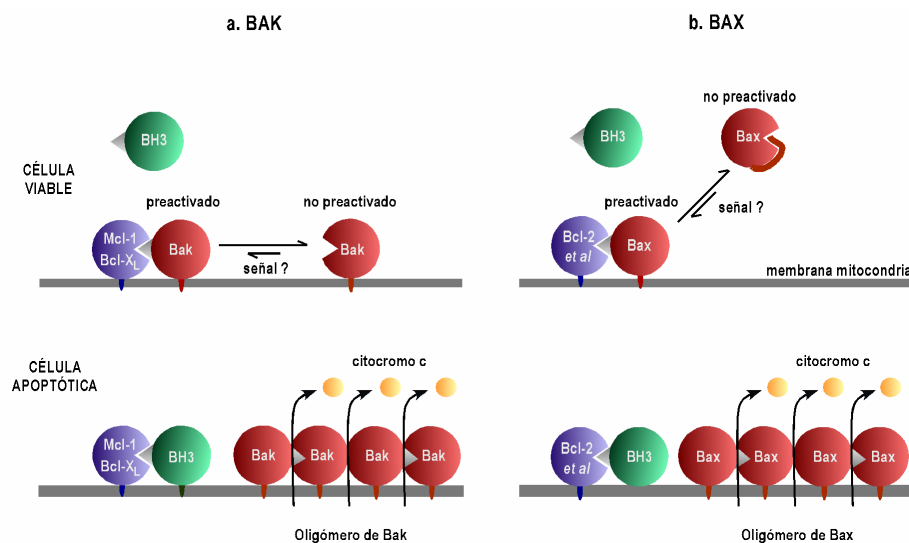


Figura 4. Modelo de regulación de Bak (a) y Bax (b) por sus homólogos antiapoptóticos (Adams y Cory, *Oncogene*, 2007).

Sin embargo, según la estructura de Bak (Moldoveanu, Liu et al. 2006) y Bax (Suzuki, Youle et al. 2000), el dominio BH3 está oculto y, por tanto, normalmente inaccesible para la unión de proteínas antiapoptóticas. No obstante, se ha propuesto que en células viables, una proporción pequeña de Bak y Bax estaría en un estado “preactivado”, en el que el dominio BH3 estaría expuesto pero su actividad proapoptótica bloqueada por proteínas antiapoptóticas (Willis, Chen et al. 2005) (Figura 4, panel superior).

Las proteínas en estado preactivado posiblemente se formen temprano en la señalización apoptótica, bien espontáneamente, o bien en respuesta a una señal citotóxica independiente (Willis, Fletcher et al. 2007). Por ejemplo, la fosforilación de Bax podría regular su translocación a la membrana (Gardai, Hildeman et al. 2004; Kim, Ryu et al. 2006) por lo cual todas las versiones “preactivadas” de Bax probablemente estén localizadas en membranas de los diferentes orgánulos (Hsu y Youle 1998). Además, se cree que el dominio BH3 de Bak no solamente es necesario para la inhibición por miembros antiapoptóticos, sino también para la oligomerización de la proteína, una vez ésta esté liberada de sus homólogos protectores de tipo Bcl-2. Esto vendría definido por un modelo en el que una forma preactivada de Bak dimerizaría con una forma no preactivada, que funcionaría de receptor (Adams y Cory 2007) (Figura 4, panel inferior). La activación de Bak y Bax incluye, por tanto, un cambio conformacional y la oligomerización.

2.6. FACTORES APOPTOGÉNICOS

Una vez presentes en forma de oligómeros, se piensa que Bak y Bax permeabilizan la membrana externa de la mitocondria (MOMP, del inglés *mitochondrial outer membrane permeabilization*), liberando factores apoptogénicos del espacio intermembrana, como el citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, la endonucleasa G (Endo G) y AIF (van Gurp, Festjens et al. 2003).

2.6.1. Citocromo c y Smac/DIABLO

Entre los factores apoptogénicos cuya liberación de la mitocondria es decisiva para la ejecución de apoptosis, se encuentra el citocromo c y la proteína Smac/DIABLO (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000). En células viables, el citocromo c está localizado en la membrana mitocondrial interna expuesto hacia el lado intermembrana y ejerce una función metabólica como componente de la cadena respiratoria mitocondrial. En respuesta a un estímulo de muerte celular, sin embargo, esta molécula es integrada en la señalización apoptótica mediante su liberación al citoplasma desde donde participa en la activación de la caspasa 9 a través del complejo del apoptosoma (Garrido, Galluzzi et al. 2006). Smac/DIABLO (del inglés *Second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) es liberado de forma conjunta y coordinada con el citocromo c. Para promover apoptosis, Smac/DIABLO disminuye la inhibición de las caspasas al unirse a los inhibidores de éstas: la familia de los IAP. De este modo, Smac/DIABLO rompe la asociación de los IAP con la caspasa 9, que a su vez activa posteriormente a la caspasa 3 (Ekert, Silke et al. 2001). En algunos sistemas, el citocromo c es necesario, pero no suficiente, para la inducción de apoptosis, por lo cual la acción de Smac/DIABLO podría adquirir aquí una relevancia mayor.

2.6.2. Mecanismo de liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria

El mecanismo preciso a través del cual estas proteínas están liberadas todavía es objeto de investigaciones activas. Sin embargo, se han considerado dos modelos principales que provocan ambas MOMP (Garrido, Galluzzi et al. 2006):

1.) El primero propone que Bak y Bax interactuarían con proteínas residentes de la membrana mitocondrial, desencadenando una transición en la permeabilidad de la mitocondria (MPT, del inglés *mitochondrial permeability transition*). Según este modelo, se activaría la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP, del inglés *permeability transition pore*), un complejo multiproteico entre cuyos componentes se cree que se encuentran la proteína VDAC (del inglés *voltage-dependent anion channel*), situada en la membrana exterior, ANT (del inglés *adenine nucleotide translocator*) de la membrana interior y ciclofilina D, que reside en la matriz. La apertura del poro permite la entrada de pequeñas solutos y agua a la matriz mitocondrial, resultando en una dilatación osmótica, la ruptura de ambas membranas mitocondriales y consecuentemente en MOMP. Sin embargo, algunos estudios han establecido que existe una liberación sustancial de citocromo c claramente antes de dicha dilatación y ruptura de la mitocondria.

2.) Alternativamente, se postula que las proteínas Bak o Bax oligomerizadas formarían poros en la membrana exterior de la mitocondria (MOM, por *mitochondrial outer membrane*) capaces de liberar el citocromo c (Antignani e Youle 2006). Este modelo tiene su base en la similitud estructural de moléculas de la familia Bcl-2 con las hélices de toxinas bacterianas formadoras de poros (Muchmore, Sattler et al. 1996). Además, existe evidencia de que Bax tiene capacidad para generar canales en membranas artificiales y provocar la liberación de citocromo c de liposomas. Según este modelo, el ensamblaje de poros resultaría en MOMP y la liberación de factores apoptogénicos sin afectar directamente ni a la membrana interna ni a la matriz mitocondrial.

Recientemente, también se ha observado que Bak y Bax son capaces de influir en la morfología de la mitocondria mediante efectos sobre la maquinaria de fisión y fusión de este orgánulo (Karbowski, Norris et al. 2006). Si esto puede contribuir a la permeabilización de la membrana exterior de la mitocondria y la liberación de proteínas del espacio intermembrana, es todavía un tema de investigación activa (Perfettini, Roumier et al. 2005; Parone, James et al. 2006).

3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN APOPTOSIS

En mamíferos se han descrito, hasta el momento, dos principales vías de señalización que desencadenan la activación de la maquinaria apoptótica central, las caspasas, y por tanto la ejecución de apoptosis: la vía intrínseca, iniciada en la mitocondria, y la vía extrínseca, desencadenada por los receptores de membrana denominados “receptores de muerte” (Strasser, O'Connor et al. 2000) (Figura 5).

3.1. VÍAS EXTRÍNSECAS

Las vías extrínsecas responden a estímulos del exterior de la célula, por lo que conectan el espacio extracelular con la maquinaria apoptótica. Estos estímulos, habitualmente ligandos, se unen a receptores específicos transmembrana, denominados “receptores de muerte”. Una vez unido el ligando al receptor, el ligando induce la agregación del receptor, y la parte citosólica del receptor recluta proteínas adaptadoras (como FADD, TRADD y RAIDD) mediante asociaciones de dominios DD, lo que activa las caspasas 8 y 10. Estas caspasas iniciadoras, a su vez, inducen directamente la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 que finalmente provocan la destrucción de la célula mediante proteólisis de cientos de sustratos celulares (Nagata 1997).

3.2. VÍA INTRÍNSECA O VÍA MITOCONDRIAL

La vía más antigua y conservada durante la evolución es la vía intrínseca o vía mitocondrial. Esta vía de señalización está regulada principalmente por los miembros de la familia Bcl-2, y es desencadenada por un amplio rango de estímulos de estrés, originados en el interior de la célula. Estas señales intrínsecas, como el daño en el ADN, la activación de supresores de tumores (p53), agentes quimioterapéuticos, radiación o retirada de factores de crecimiento, activan los miembros proapoptóticos BH3-*only*, que a su vez activan a sus homólogos proapoptóticos Bak y Bax. Una vez activados Bak y Bax, inducen en la mitocondria la permeabilización de la membrana externa del orgánulo, ocasionando la salida de factores apoptogénicos como el citocromo c y Smac/DIABLO desde el interior de la mitocondria al citosol. En el caso de citocromo c, éste provoca la formación del complejo proteico, el llamado apoptosoma, que facilita la autocatálisis de la procaspasa 9 a su forma madura. La caspasa activa, a su vez, promueve la activación de las caspasas efectoras 3, 6, 7 que desencadenan las últimas fases de la apoptosis (Danial y Korsmeyer 2004).

3.3. DIÁLOGO CRUZADO ENTRE VÍAS EXTRÍNSECAS Y VÍAS INTRÍNSECAS

Ambas cascadas de señalización convergen al nivel de la activación de las caspasas efectoras pero son en gran parte independientes. Sin embargo, existe en ciertos tipos celulares (como por ejemplo hepatocitos) un entrecruzamiento de ambas vías a un nivel superior con el fin de amplificar la señal apoptótica. Esta comunicación de las dos vías se establece por la caspasa 8, que no solamente activa caspasas efectoras, sino que también tiene la capacidad de procesar la proteína BH3-*only* Bid a su forma truncada y constitutivamente activa (tBid). tBid, siendo una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, finalmente desencadena la vía intrínseca de apoptosis (Danial y Korsmeyer 2004).

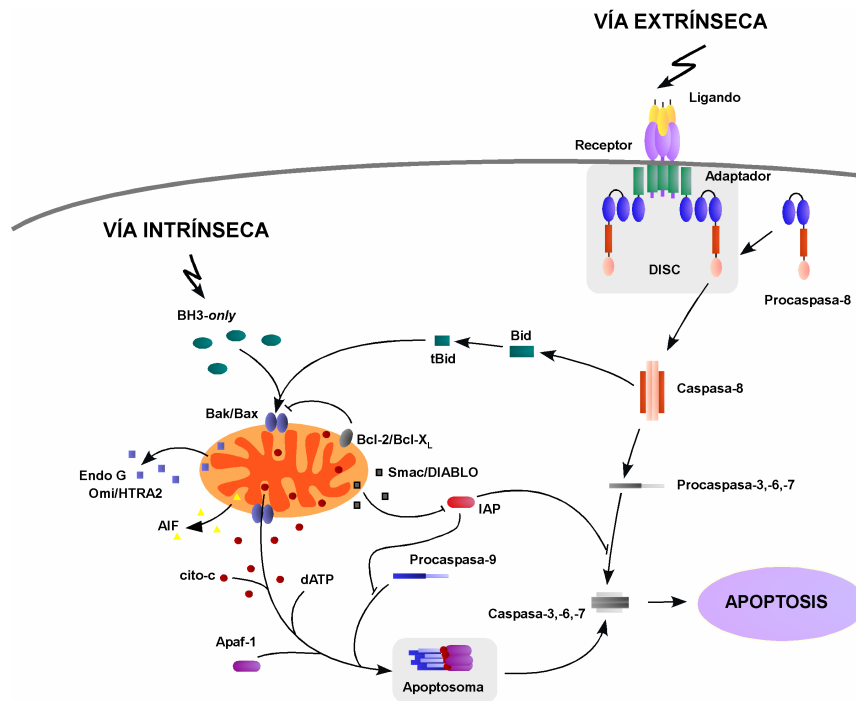


Figura 5. Vías de señalización en apoptosis.

4. EL PAPEL DEL CALCIO EN APOPTOSIS

4.1. EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El retículo endoplasmático (RE) es un compartimento subcelular constituido por cisternas (sáculos y túbulos aplanados) de sistemas membranosos, que se encuentran en continuidad estructural con la membrana externa del núcleo. Además, el RE delimita un espacio interno llamado lumen del retículo (Voeltz, Rolls et al. 2002; Borgese, Francolini et al. 2006). El RE tiene funciones celulares múltiples como la biosíntesis de lípidos y proteínas. En el caso de las proteínas, el RE interviene además en su ensamblaje y plegamiento, sus modificaciones postraduccionales y la exportación y secreción a otros compartimentos subcelulares. Asimismo, el RE representa el mayor compartimento de almacenaje de calcio de la célula, lo que le adscribe un papel importante en el mantenimiento y la regulación del calcio intracelular (Bootman, Petersen et al. 2002).

4.2. LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO

El calcio es un mensajero intracelular versátil que controla múltiples procesos de la fisiología celular y tisular (Berridge, Lipp et al. 2000). La regulación de estos procesos tiene que llevarse a cabo considerando la alta toxicidad del calcio citoplasmático. Por este motivo, la concentración del ión en el citoplasma es mantenida en niveles bajos, estando la mayoría del calcio celular almacenado en el RE. En este orgánulo, el equilibrio (la homeostasis) del calcio es mantenido por varios componentes. Por un lado, bombas Ca^{2+} -ATPasas, llamadas SERCA (del inglés *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca-ATPase*) se encargan del suministro activo de calcio desde el citoplasma al interior del RE, mientras que los canales de calcio llamados IP_3R (del inglés *IP₃ receptor*) y RyR (del inglés *ryanodine receptor*) realizan la exportación al citoplasma (Berridge, Lipp et al. 2000), siendo el primero el principal canal de la liberación de calcio en respuesta a estímulos fisiológicos (y apoptóticos) y estando su actividad regulada de varias maneras, como por ejemplo por el calcio mismo, citocromo c, por proteólisis, por proteínas de la familia Bcl 2 y por ATP (Joseph y Hajnoczky 2007). Una porción significativa de calcio es incorporada a la mitocondria. Esta importación se realiza a través de la MOM principalmente mediante la proteína VDAC (Gincel, Zaid et al. 2001; Rapizzi, Pinton et al. 2002; Bathori, Csordas et al. 2006), y a través de la membrana interna mediante un canal denominado el *calcium uniporter* (UP) (Kirichok, Krapivinsky et al. 2004) (Figura 6).

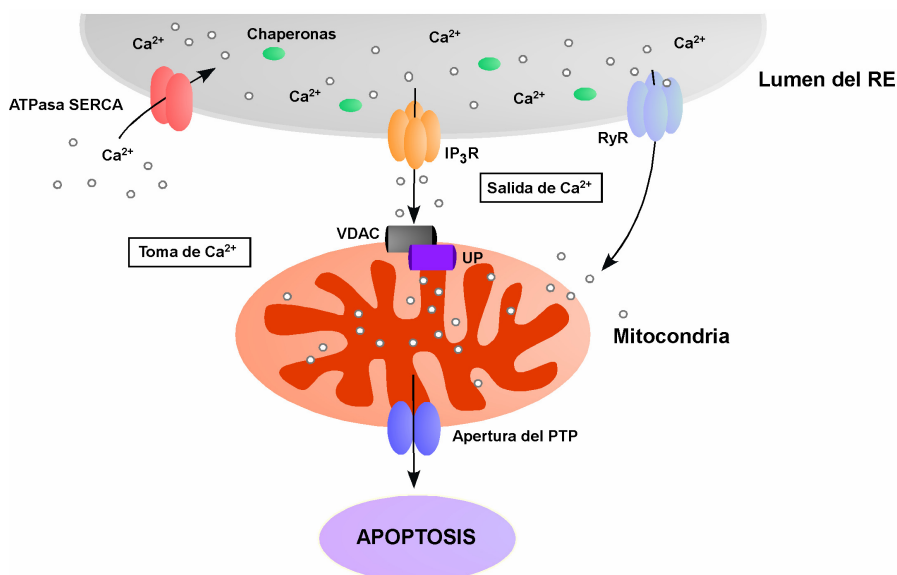


Figura 6. La homeostasis del calcio y apoptosis

Los sitios de entrada de calcio a la mitocondria generalmente están muy próximos a los canales que liberan el calcio del RE, y situados en zonas de aposición entre ambos orgánulos, denominados *close contacts* (Rizzuto, Brini et al. 1993). Estas conexiones permiten a la mitocondria modular, transmitir y

sincronizar señales de este ión (Jouaville, Ichas et al. 1995). Además, la mitocondria previene la disminución de calcio en el RE mediante el reciclaje de calcio hacia las cisternas reticulares (Arnaudeau, Kelley et al. 2001). Esta conexión estrecha RE-mitocondria permite a las señales de calcio controlar el metabolismo celular (Hajnoczky, Robb-Gaspers et al. 1995), puesto que la concentración de calcio mitocondrial condiciona muchos procesos metabólicos de este orgánulo. Además, los tránsitos de calcio entre el RE y la mitocondria juegan un papel importante en la inducción de apoptosis.

4.3. CALCIO Y APOPTOSIS

La implicación del calcio en el proceso de muerte celular se ha constatado casi al mismo tiempo que el descubrimiento de la apoptosis (Fleckenstein, Janke et al. 1974; Leonard y Salpeter 1979; Schanne, Kane et al. 1979; Choi 1992).

La alteración de la homeostasis del calcio, sea por una sobrecarga de calcio citoplasmático, sea por tránsitos fisiológicos de calcio en respuesta a un estímulo proapoptótico, pueden ocasionar un exceso de calcio mitocondrial. Esta situación favorece en la mitocondria la interacción del calcio con ciclofilina D, que en combinación con otros factores como ROS (del inglés *reactive oxygen species*) induce la apertura del PTP (Basso, Fante et al. 2005). Si el exceso de calcio permanece, el PTP causa la ruptura de la MOM y la liberación de factores apoptogénicos, como el citocromo c, que finalmente conducen a la apoptosis (Szalai, Krishnamurthy et al. 1999; Hajnoczky, Csordas et al. 2000; Pacher y Hajnoczky 2001; Pinton, Ferrari et al. 2001) (Figura 6). Además, los canales de exportación de calcio del RE, como el IP₃R, muestran alta afinidad por el citocromo c liberado de la mitocondria, cuya asociación bloquea la inhibición de estos canales por calcio, proporcionando un bucle de amplificación de la señal apoptótica (Boehning, Patterson et al. 2003).

El cambio de una señal de supervivencia a una señal apoptótica, por tanto, depende del nivel de calcio en la mitocondria, que a su vez depende mayoritariamente del contenido de calcio en el RE, por lo que, tras un estímulo apoptótico, el contenido de calcio en el RE determina la sensibilidad de la mitocondria para sufrir apoptosis.

En concordancia con la visión de que el tránsito de calcio entre el RE y la mitocondria induce apoptosis, procesos que reducen la concentración de calcio en el RE, como son la reducción de los niveles de calreticulina o la inhibición de la ATPasa SERCA de la membrana reticular, tienen un efecto protector (Nakamura, Bossy-Wetzel et al. 2000; Pinton, Ferrari et al. 2001), mientras que el incremento de la concentración de calcio reticular, por ejemplo por sobreexpresión de SERCA o calreticulina, sensibilizan a apoptosis (Pinton, Ferrari et al. 2001; Arnaudeau, Frieden et al. 2002).

Además, la predisposición a apoptosis no solamente depende de la carga de calcio del RE, sino también de la capacidad de las células de transferir el calcio entre los dos orgánulos. Por ejemplo,

procesos que incrementan el tránsito de calcio del RE a la mitocondria aumentan la muerte celular inducida por ceramida (Rapizzi, Pinton et al. 2002).

5. LA FAMILIA BCL-2 Y LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS DESDE EL RE

5.1. LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO POR LA FAMILIA BCL-2

La actividad apoptótica de los miembros de la familia Bcl-2 inicialmente se ha asociado a su presencia en la membrana externa de la mitocondria. Gracias a numerosos estudios, hoy en día, tanto las funciones de sus miembros en la mitocondria como la importancia de este orgánulo en la regulación y ejecución de la vía apoptótica intrínseca, en su mayoría están bien establecidas. No obstante, otros estudios durante los últimos años han revelado la presencia de algunos de los miembros de la familia Bcl-2 en membranas del RE. Se ha visto que en este orgánulo la familia Bcl-2 tiene funciones en varios procesos, en parte diferentes a sus actividades apoptóticas. Entre ellas, la función que mejor se ha descrito es la regulación de la homeostasis del calcio (Rong y Distelhorst 2007) (Figura 7).

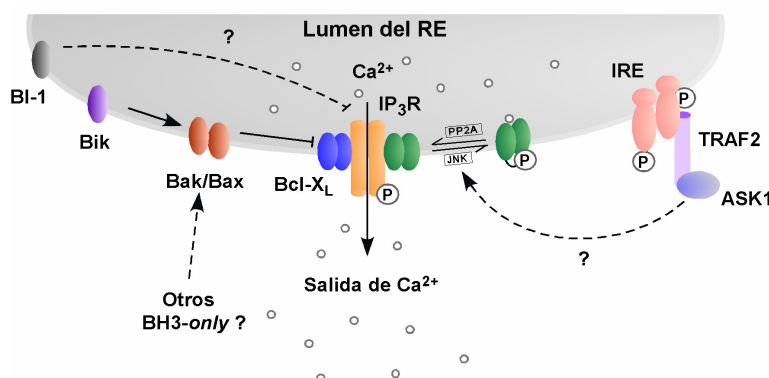


Figura 7. Regulación de la homeostasis del calcio reticular por la familia Bcl-2.

Bak y Bax localizados en el RE (Wei, Zong et al. 2001; Nutt, Pataer et al. 2002; Zong, Li et al. 2003) facilitan el tránsito de calcio desde este orgánulo a la mitocondria (Pan, Bhat et al. 2001; Nutt, Chandra et al. 2002; Nutt, Pataer et al. 2002). Células deficientes en ambos genes presentan una concentración de calcio reticular reducida (Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003), mientras que la sobreexpresión tanto de Bak como de Bax favorece la salida de calcio del RE y el incremento de calcio mitocondrial (Pan, Bhat et al. 2001; Nutt, Chandra et al. 2002; Nutt, Pataer et al. 2002). En cambio, células que sobreexpresan proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, presentan una concentración de calcio reticular disminuida (Bassik, Scorrano et al. 2004). Además, la sobreexpresión de otros miembros proapoptóticos, como la proteína BH3-*only* Bik, reclutan Bax al RE y también ocasionan la liberación de calcio del lumen reticular (Mathai, Germain et al. 2005).

A nivel bioquímico se ha visto que miembros de la familia Bcl-2 se asocian con componentes reguladores de calcio. En *S. pombe*, Bak y Bax interaccionan con el extremo citosólico de la chaperona reticular calnexina (Torgler, de Tiani et al. 1997). Además, se ha descrito que miembros antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-X_L forman complejos proteicos con los receptores IP₃, a través de los cuales pueden inhibir la actividad de estos canales de exportación de calcio (Chen, Valencia et al. 2004; Oakes, Scorrano et al. 2005; White, Li et al. 2005), lo que les adscribe finalmente un efecto antiapoptótico.

Bcl-2 también puede incrementar la capacidad de la mitocondria de almacenar calcio (Murphy, Bredesen et al. 1996; Ichimiya, Chang et al. 1998; Zhu, Ling et al. 1999), presumiblemente mediante la inhibición de un tránsito de permeabilidad en la membrana de la mitocondria a través del PTP. A su vez, Bcl-2 está sujeto a regulación en el RE. Por ejemplo, Bcl-2 es fosforilado por JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) en las membranas del RE, un fenómeno que regula su actividad antiapoptótica de manera negativa (Bassik, Scorrano et al. 2004). Además, Bcl-2 forma parte de un complejo proteico que contiene la serina-treonina fosfatasa PP2A capaz de regular la actividad antiapoptótica del protooncogen en el RE mediante desfosforilación (Lin, Bassik et al. 2006). Por tanto, la presencia de Bcl-2 en la mitocondria y en el RE indica que esta proteína puede prevenir un diálogo cruzado entre los dos compartimentos mediante la reducción de la concentración de calcio reticular liberable por los canales IP₃R/RyR, y mediante un incremento en la tolerancia de la mitocondria a niveles altos de carga de calcio. En cambio, Bak y Bax son capaces de incrementar este diálogo cruzado.

Además, se sabe que las proteínas tanto pro como antiapoptóticas tienen capacidad de formar poros en membranas (Antonsson y Martinou 2000), por lo cual teóricamente podrían regular los flujos de otros iones a través de las diferentes membranas en las que se localizan.

5.2. EL PAPEL DE LA FAMILIA BCL-2 EN APOPTOSIS MEDIADA POR SEÑALES DE CALCIO

En la bibliografía numerosos trabajos apuntan a una función de la familia Bcl-2 en el control de la apoptosis desde el RE. Esta actividad apoptótica se ha asociado en parte con la regulación de la homeostasis del calcio. En concordancia con lo que ya está demostrado en el contexto de la mitocondria, en el RE el equilibrio entre proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas también parece ser decisivo para la inducción de apoptosis a través de su influencia en la homeostasis del calcio.

La presencia de Bak y Bax en membranas reticulares no solamente es un requisito indispensable para que el almacenaje y la movilización del calcio sean óptimas, sino que también es crítica para la inducción de apoptosis en varios modelos de muerte celular desde este orgánulo (Nutt, Pataer et al. 2002; Breckenridge, Germain et al. 2003; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003; Rong y Distelhorst 2007). Por ejemplo, células deficientes tanto en Bak como en Bax, que son altamente resistentes a un amplio rango de señales apoptóticas (incluyendo aquellas estimuladas por moléculas BH3-*only* iniciadoras

de las vías apoptóticas, estímulos que inducen daño en el ADN, estimuladores apoptóticos ampliamente usados como staurosporina (STS), agentes farmacológicos cuya actividad proapoptótica depende del calcio reticular (Scorrano, Oakes et al. 2003), y otros agentes que ocasionan estrés en el RE (Wei, Zong et al. 2001; Zong, Li et al. 2003)), y cuya insensibilidad a muerte celular en general se asocia con una incorporación reducida de calcio a la mitocondria (Nutt, Chandra et al. 2002; Scorrano, Oakes et al. 2003), recuperan la inducibilidad parcial o completa de apoptosis en respuesta a varios de estos estímulos que usan calcio reticular (C_2 -ceramida, el ácido araquidónico (ArA) o el agente oxidativo H_2O_2). Esto ocurre cuando en estas células se restablecen los niveles de calcio en el RE (mediante sobreexpresión de la ATPasa SERCA, por ejemplo), y se correlaciona con un incremento en el calcio mitocondrial (Pinton, Ferrari et al. 2001; Scorrano, Oakes et al. 2003). Asimismo, células deficientes en uno de los genes restablecen tanto el nivel de calcio reticular como su liberación cuando se restaura la expresión, lo que además puede acelerar la salida de citocromo c y finalmente la apoptosis inducida, por ejemplo, por STS (Nutt, Chandra et al. 2002).

Al igual que en la mitocondria, Bak y Bax pueden formar oligómeros en el RE, lo que sugiere mecanismos activadores similares. Este proceso se observa, por ejemplo, durante el estrés del RE (Zong, Li et al. 2003), un tipo de estrés celular que se explica en detalle más adelante. Por tanto, Bak y Bax parecen tener un papel dual en el RE y la mitocondria, y regulan la comunicación entre estos dos orgánulos a través de flujos de calcio.

Los miembros antiapoptóticos Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-X_L también están presentes en membranas reticulares (Yang, Kozopas et al. 1995; Annis, Yethon et al. 2004). La sobreexpresión de estas proteínas antiapoptóticas reduce el contenido de calcio reticular que tiene un efecto inhibitorio de apoptosis (Foyouzi-Youssefi, Arnaudeau et al. 2000; Pinton, Ferrari et al. 2000; Bassik, Scorrano et al. 2004). Asimismo, Bcl-2 y Bcl-X_L pueden inhibir la movilización de calcio por Bak y Bax y reducir la apoptosis mediada por estrés reticular (Bassik, Scorrano et al. 2004; Morishima, Nakanishi et al. 2004; Ruiz-Vela, Opferman et al. 2005). Estudios de expresión selectiva de Bcl-2 en diferentes compartimentos subcelulares revelaron que una versión de Bcl-2 fusionada con la secuencia transmembrana del citocromo b 5 (Bcl-2-cb5) se dirige exclusivamente al RE y muestra actividades antiapoptóticas en este orgánulo, protegiendo así la célula de apoptosis inducida por varios estímulos, como agentes de estrés reticular, ceramida, radiación ionizante o sobreexpresión de Bax (Hacki, Egger et al. 2000; Annis, Zamzami et al. 2001; Rudner, Lepple-Wienhues et al. 2001; Wang, Gastman et al. 2001).

De manera parecida actúa la proteína antiapoptótica transmembrana, Inhibidor de Bax de tipo 1 (del inglés Bax inhibitor-1). BI-1 está primordialmente localizada en las membranas del RE y, aun no siendo una molécula de tipo Bcl-2, sí comparte algunas características con los miembros antiapoptóticos de esta familia. Por ejemplo, BI-1 parcialmente inhibe la muerte celular en respuesta a estrés reticular, y la expresión de BI-1 altera la homeostasis del calcio, ocasionando una reducción del contenido de calcio

reticular (Xu y Reed 1998; Chae, Kim et al. 2004; Westphalen, Wessig et al. 2005; Xu, Xu et al. 2008) (Figura 7).

Sin embargo, acerca del efecto de Bcl-2 en la movilización de calcio hay datos contradictorios. Como ya se ha mencionado, hay trabajos que demuestran que Bcl-2 reduce la concentración de calcio reticular de una forma mediada por un incremento en la permeabilidad de la membrana reticular (Pinton, Ferrari et al. 2000). En concordancia con esta observación, se encuentran ejemplos en la bibliografía en los que la reducción artificial de calcio reticular protege células de la muerte celular, mientras que otras manipulaciones que lo incrementan sensibilizan las células a apoptosis (Nakamura, Bossy-Wetzel et al. 2000; Pinton, Ferrari et al. 2001; Lilliehook, Chan et al. 2002). No obstante, otros datos indican que Bcl-2 precisamente incrementa o mantiene el contenido de calcio reticular o inhibe su salida durante la apoptosis (manteniendo así la concentración en el lumen reticular) (Lam, Dubyak et al. 1994; Distelhorst, Lam et al. 1996; He, Lam et al. 1997, Ichimiya, 1998 #196; Nutt, Pataer et al. 2002).

Miembros de la subfamilia BH3-*only*, como las proteínas Spike (Mund, Gewies et al. 2003) y Bik (Mathai, Germain et al. 2002; Mathai, Germain et al. 2005), también están situados en el RE o pueden translocarse a las membranas reticulares (Oakes, Lin et al. 2006). En el caso de Bik, su ARNm se induce por p53 en respuesta a daño genético o estrés oncogénico (Germain, Mathai et al. 2002; Mathai, Germain et al. 2002). Una vez activado, Bik parece ser capaz de promover la liberación de calcio. Bak reticular se oligomeriza tras la sobreexpresión de Bik, y Bik necesita Bak y Bax para desencadenar la liberación de calcio, la salida de citocromo c de la mitocondria y la apoptosis (Germain, Mathai et al. 2002; Mathai, Germain et al. 2005). Asimismo, la combinación de microsomas y citosol, pero no solamente uno de los componentes, puede inducir la salida de citocromo c de la mitocondria en experimentos *in vitro*. Esto sugiere que Bik activa tanto factores en el RE como en el citosol que inducen apoptosis mitocondrial (Germain, Mathai et al. 2002). En esta actividad de Bik influye Bcl-2 en el RE, dado que heterodímeros Bik/Bcl-2 se pueden agregar en la superficie del RE. Además, abundancias relativas altas de Bik con respecto a Bcl-2 cambian el tipo de proteínas que interaccionan con Bcl-2 en el RE, lo que resulta en la liberación de calcio y citocromo c, ocasionando apoptosis. Sin embargo, la presencia de Bcl-2 en exceso bloquea la apoptosis inducida por Bak. Esto sugiere que la relación entre proteínas BH3-*only* y proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en el RE puede regular señales emitidas de éste orgánulo, incluyendo el calcio, que a su vez regula la liberación de citocromo c de la mitocondria.

Otro ejemplo para la asociación de un miembro BH3-*only* con el RE es Bim, que en respuesta a condiciones de estrés reticular se transloca del complejo del motor de dineína al RE (Morishima, Nakanishi et al. 2004).

Asimismo, se ha mostrado que las proteínas Puma y Noxa son inducidas al nivel transcripcional en células que sufren estrés reticular prolongado (Reimertz, Kogel et al. 2003; Futami, Miyagishi et al. 2005). De hecho, células MEF deficientes en *puma* o *nox*a son parcialmente resistentes a apoptosis inducida por daño en el RE (Li, Lee et al. 2006). Puma además interacciona con Bax y modula la

homeostasis del calcio reticular (Luo, He et al. 2005). Además, Puma puede ser inhibido en el RE por la chaperona p23 (Rao, Niazi et al. 2006).

Aunque todas estas evidencias asocian a la familia Bcl-2 claramente con la homeostasis y movilización del calcio, aún no hay un consenso sobre el mecanismo a través del cual estas proteínas finalmente inducen apoptosis desde el RE. Lo que sí se sabe es que la liberación diferencial de calcio del RE tiene un impacto directo en la cantidad de calcio recibida por la mitocondria, lo que desencadena la permeabilización de su membrana. Dado que la expresión de Bak y Bax en la mitocondria es un requisito para la activación de apoptosis en respuesta a múltiples estímulos, esto sugiere la existencia de una comunicación entre miembros de la familia Bcl-2 localizados en el RE con los mismos situados en la mitocondria, y/o la existencia de otros componentes que forman parte de un mecanismo de comunicación entre el RE y la mitocondria para inducir apoptosis.

6. LA FAMILIA BCL-2 Y LA REGULACIÓN DE SEÑALES DE ESTRÉS DEL RE

6.1. ESTRÉS DEL RE

Cuando las proteínas no son plegadas de manera adecuada en el RE, se produce la sobrecarga y congestión de este orgánulo. Esta situación se ha denominado “estrés del RE”. En estas condiciones, la célula desencadena una serie de vías de señalización que garantizan la eliminación de las proteínas desplegadas y el restablecimiento de las condiciones fisiológicas para el funcionamiento normal del RE. Esta adaptación fisiológica de la célula es conocida como “respuesta a proteínas desplegadas” o UPR (del inglés *unfolded protein response*) (Schroder y Kaufman 2005).

El estrés de RE puede ser inducido *in vitro* mediante agentes farmacológicos que interfieren en las funciones normales del orgánulo, concretamente en la biosíntesis, las modificaciones postraduccionales y el transporte de las proteínas a otros compartimentos. Estas sustancias pueden ser, por ejemplo, tunicamicina, que inhibe la N-glicosilación, o brefeldina A, que impide la segregación de proteínas del RE al aparato de Golgi, o sustancias que interfieran en la disponibilidad de calcio del RE, como ionóforos o tapsigargín, que bloquea la Ca²⁺-ATPasa SERCA del RE.

6.2. LA RESPUESTA A PROTEÍNAS DESPLEGADAS (UPR)

En organismos superiores, la UPR es un proceso complejo mediado por al menos tres vías de señalización inducidas por las proteínas sensoras IRE1 (del inglés *inositol-requiring-enzyme-1*), PERK (del inglés *PKR-like ER kinase*) y ATF6 (del inglés *activation transcription factor 6*). Estas proteínas transmiten señales de adaptación y supervivencia al citosol y al núcleo y ocasionan la inducción de genes propios de

la UPR (como chaperonas y proteínas catalizadoras del plegamiento), la reducción de la síntesis de proteínas y la degradación asociada con el RE (ERAD, del inglés *ER-associated degradation*) (Ron y Walter 2007) (Figura 8).

6.2.1. Cascada de señalización de IRE1

La vía de la UPR más conservada en eucariotas es la vía de IRE1. IRE1 es una glicoproteína transmembrana del RE que presenta actividades de serina-treonina quinasa como de endorribonucleasa (Ron y Walter 2007). En condiciones de estrés reticular IRE1 se multimeriza y se autofosforila en su dominio citosólico, lo que desencadena la función ARNasa que se encarga del *splicing* del ARNm cuyo producto es el factor de transcripción XBP-1 (del inglés *transcriptional factor X-Box-binding protein 1*) (Yoshida, Matsui et al. 2001; Calton, Zeng et al. 2002; Lee, Tirasophon et al. 2002). XBP-1 induce un amplio rango de genes relacionados con la UPR, como genes implicados en el plegamiento de proteínas, el metabolismo redox, la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD) y el control de calidad de proteínas (Lee, Iwakoshi et al. 2003).

6.2.2. Cascada de señalización de PERK

La segunda vía de la UPR está mediada por la quinasa transmembrana PERK. Una vez activada, PERK fosforila e inhibe el factor de iniciación de traducción eIF2 α , que, al disminuir globalmente la traducción, a su vez ocasiona la disminución del número de proteínas desplegadas. Asimismo, PERK controla la expresión de ATF4 (del inglés *activating transcription factor 4*), un factor de transcripción que induce la expresión de genes de la UPR implicados en los metabolismos de aminoácidos y redox, como *chop/gadd153* y *gadd34* (Ron y Walter 2007).

6.2.3. Cascada de señalización de ATF6

Una tercera vía está mediada por ATF6, una proteína transmembrana de tipo II que codifica un factor de transcripción denominado bZIP. En condiciones de estrés reticular, ATF6 se transloca al aparato de Golgi, donde su proteólisis produce la liberación de su dominio citoplasmático. Este fragmento finalmente migra al núcleo donde funciona como activador transcripcional. A su vez, ATF6 puede inducir *xbp-1* y así proporcionar un bucle de amplificación para la UPR (Ron y Walter 2007).

6.2.4. Degradación asociada al RE

Las vías de señalización de la UPR no solamente inducen la transcripción de genes relacionados con el plegamiento de proteínas sino también genes que median la degradación asociada al RE (ERAD). Esta degradación es un componente importante de la UPR y estimula la eliminación de proteínas desplegadas a través del sistema de ubiquitina-proteasoma (Schroder y Kaufman 2005).

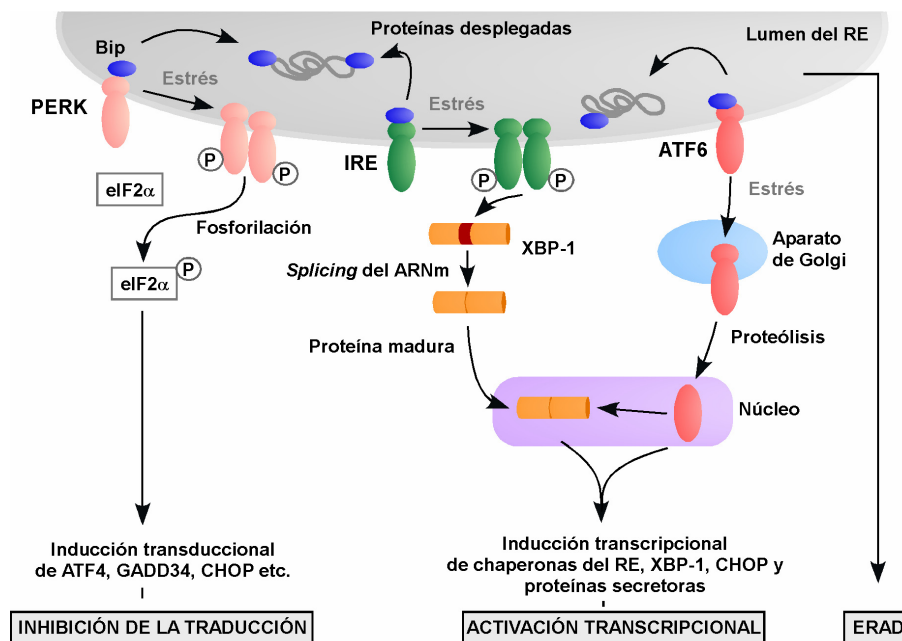


Figura 8. La respuesta de supervivencia de la UPR.

6.3. LA IMPLICACIÓN DE LA FAMILIA BCL-2 EN LA UPR

Recientemente se ha descrito que miembros de la familia Bcl-2 tienen un papel en la regulación de la UPR. En concreto, se ha demostrado que los homólogos proapoptóticos Bak y Bax son capaces de establecer interacciones directas con IRE1 α a través de las cuales promueven su activación (Figura 9). Esto se ha observado a partir de estudios de la UPR en ratones deficientes en Bak y Bax que mostraron una deficiencia en la capacidad de autofosforilación y oligomerización de IRE1 α . Como consecuencia se redujo también la expresión de señales dependientes de IRE1 α , como el *splicing* de *xbp-1* y la fosforilación de la Jun-quinasa (JNK). En concordancia con lo dicho, en un modelo animal inducible para Bak y Bax se pudieron observar defectos en la respuesta a estrés reticular en el hígado cuando los ratones se expusieron a tunicamicina. Al nivel bioquímico, se ha visto que Bak y Bax forman un complejo proteico con el dominio citosólico de IRE1 α , que es precisamente el dominio de localización de sus actividades enzimáticas. Esta asociación se incrementa en células que sufren estrés reticular, y depende de la presencia de los dominos BH3 y BH1. Por tanto, se ha postulado un mecanismo en el cual Bak y Bax facilitarían la activación de IRE1 α mediante la estabilización de su forma activa en un complejo proteico (Hetz, Bernasconi et al. 2006).

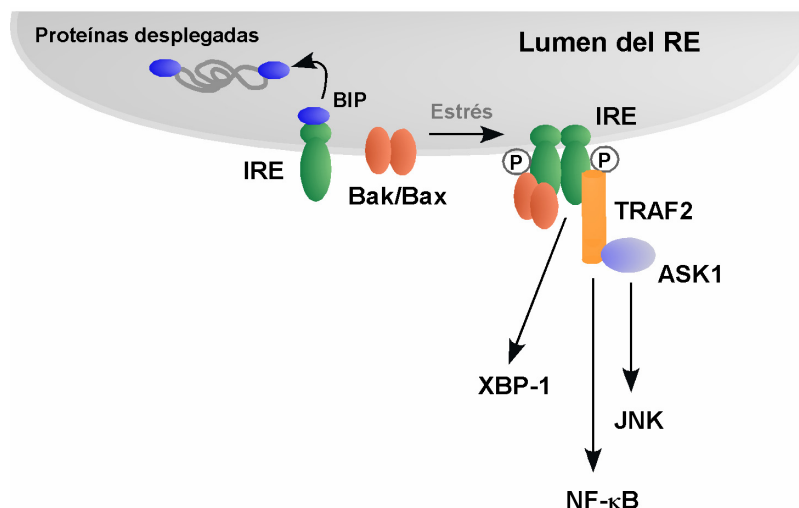


Figura 9. Regulación de la UPR por Bak y Bax.

En conclusión, estos datos sugieren un nuevo papel de Bak y Bax en el contexto de la UPR, donde estos dos homólogos funcionarían como proteínas accesorias más implicadas en supervivencia celular. Por tanto, Bak y Bax serían capaces de ejercer funciones opuestas a sus actividades proapoptóticas clásicas (Hetz, Bernasconi et al. 2006).

6.4. LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ESTRÉS DEL RE

En condiciones de estrés reticular severo y/o prolongado, que no permiten subsanar el deterioro producido en el interior del RE, las células finalmente activan el proceso de apoptosis (Ron y Walter 2007).

Hasta ahora se han descrito varias vías de señalización apoptótica asociadas o directamente inducidas por estrés reticular (Szegezdi, Logue et al. 2006; Hetz 2007). Sin embargo, todavía no se ha podido obtener un consenso sobre un mecanismo común a todos estos procesos. A continuación se recopilan las diversas observaciones que se han hecho en relación con la señalización apoptótica provocada por este tipo de estrés intracelular (Figura 10).

6.4.1. Vías mediadas por componentes de la UPR

La señalización de las proteínas iniciadores de la UPR puede contribuir en último término a muerte celular. Aún así, estas moléculas no inducen muerte celular de forma directa, sino mediante proteínas que están localizadas más abajo en sus vías de señalización, como CHOP y JNK.

6.4.1.1. La vía de IRE1/TRAF2/ASK/JNK

En condiciones de estrés reticular prolongado, IRE1 induce una vía apoptótica mediada por su dominio citosólico. Este dominio se une a la proteína adaptadora TRAF2 (del inglés *INFR-associated factor 2*), que a su vez desencadena la activación de la vía del factor nuclear-kappa beta (NF-κB) (Hu, Han et al. 2006). Además, TRAF2 recluta al complejo y activa la quinasa ASK-1 (del inglés *apoptosis signal-regulating kinase 1*), dando lugar a la inducción de la vía de la Jun-quinasa (JNK) (Nishitoh, Saitoh et al. 1998; Urano, Wang et al. 2000; Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002) (Figuras 9 y 10). Se sabe que JNK puede fosforilar al Bcl-2 localizado en el RE. Esta fosforilación provoca que Bcl-2 sea incapaz de secuestrar e inhibir proteínas proapoptóticas de tipo BH3-*only* y que además pierda el control sobre la regulación del calcio (Figuras 7 y 10). Por estos motivos, la fosforilación de Bcl-2 por JNK tiene un efecto proapoptótico (Bassik, Scorrano et al. 2004). Asimismo, JNK puede fosforilar, y por tanto activar, miembros BH3-*only* de la familia como por ejemplo Bim (Lei y Davis 2003) o Bad (Donovan, Becker et al. 2002) (Figura 10). Esto sugiere que JNK se activa por estrés reticular y posteriormente fosforila proteínas Bcl-2, que a su vez inducirían la activación de Bak y Bax. Además, como ya se ha mencionado, existen datos que sitúan a Bak y a Bax en la cascada de señalización anterior a JNK. Así, en células MEF deficientes tanto para Bax como para Bcl-2, tunicamicina es incapaz tanto de inducir XBP-1 como de provocar la fosforilación de JNK, y la recuperación de la expresión de Bak en estas células restablece estas actividades. Dado que ahora se sabe que Bak y Bax también están localizados en el RE y pueden formar complejos con IRE1, el estrés reticular posiblemente induzca JNK a través de IRE1/Bak/Bax en el RE y JNK activado, posteriormente, active Bak y Bax en la mitocondria para inducir apoptosis (Figura 10). Además, se ha descrito que en células murinas bajo estrés reticular, la caspasa 12 es activada por calpains a su forma madura (Nakagawa e Yuan 2000; Nakagawa, Zhu et al. 2000) y puede ser reclutada al complejo TRAF2/IRE a través de una asociación con TRAF2 (Yoneda, Imaizumi et al. 2001) (Figura 10). Estos datos aportaron una conexión directa entre TRAF2/IRE y la maquinaria de las caspasas.

6.4.1.2. CHOP/GADD153

El estrés en el RE induce la expresión de CHOP/GADD153 (del inglés *C/EBP homologous protein / growth-arrest-and DNA-damage-inducible gene 153*) por las tres vías de la UPR, aunque la vía prevalente es la de PERK-eIF2α-ATF4. Estudios en células MEF deficientes en *chop* han revelado que la ausencia de CHOP confiere a las células una resistencia parcial a la apoptosis inducida por estrés reticular (Zinszner, Kuroda et al. 1998). En concordancia con esto, la sobreexpresión de CHOP puede inducir apoptosis de un modo asociado a la activación y a la translocación de Bax a la mitocondria (Matsumoto, Minami et al. 1996; McCullough, Martindale et al. 2001). Esta actividad proapoptótica de CHOP es mediada por uno de sus genes diana, el producto génico Bcl-2. CHOP funciona como un regulador negativo de Bcl-2, inhibiendo su expresión y favoreciendo el incremento de las actividades de proteínas

proapoptóticas. Además, CHOP puede inducir la expresión de DR5 (Yamaguchi y Wang 2004; Yoshida, Shiraishi et al. 2005).

6.4.1.3. GADD34

GADD34 (del inglés *growth-arrest-and DNA-damage-inducible gene 34*) es una proteína que interacciona con la proteína fosfatasa 1 (PP1) que, tras esta unión, provoca la desfosforilación de eIF2 α , lo que conlleva la anulación del bloqueo de la transducción (Brush, Weiser et al. 2003). La expresión de GADD34 se relaciona con la apoptosis inducida por varias señales, y su sobreexpresión puede iniciar o aumentar la apoptosis (Adler, Chinery et al. 1999). El mecanismo a través del cual GADD34 induce apoptosis todavía se desconoce, pero existen varias hipótesis. La recuperación de la síntesis de proteínas por GADD34, por ejemplo, podría favorecer también la traducción de proteínas proapoptóticas. Asimismo, se ha visto que la inhibición de fosfatasas que desfosforilan eIF2 α puede reducir la apoptosis inducida por estrés reticular (Marciniak, Yun et al. 2004; Boyce, Bryant et al. 2005), sugiriendo que GADD34, y por extensión eIF2 α , tiene un papel en la activación de la señalización apoptótica.

6.4.1.4. TRB3

TRB3 es uno de los genes inducibles por CHOP. Se ha visto que la reducción de su expresión confiere a las células resistencia a agentes de estrés reticular (Ohoka, Yoshii et al. 2005). Además, TRB3 puede inducir apoptosis, aunque de forma independiente del estrés reticular, al unirse a la serina-treonina quinasa Akt (Du, Herzig et al. 2003).

6.4.2. Vías mediadas por la familia Bcl-2

Como ya se ha mencionado anteriormente existen varios trabajos en la bibliografía que indican que las señales de estrés son transmitidas desde el RE a la mitocondria de manera regulada por la familia Bcl-2 (Hacki, Egger et al. 2000; Boya, Cohen et al. 2002; Zong, Li et al. 2003; Hetz 2007).

En los primeros trabajos que han relacionado a la familia Bcl-2 con el estrés del RE, se ha visto que la sobreexpresión de Bcl-2 o la deficiencia en Bak y Bax confería protección a estrés reticular (Distelhorst y McCormick 1996; Wei, Zong et al. 2001). Estudios adicionales mostraron que la sobreexpresión del inhibidor viral de apoptosis vMIA, localizado en la mitocondria (por *mitochondrion-localized viral mitochondrial inhibitor of apoptosis*), o Bcl-2-cb5 tienen la capacidad de bloquear la liberación de citocromo c y la apoptosis durante el estrés del RE. En cambio, la expresión de una versión de Bak dirigida al RE (Bak-cb5) en células deficientes tanto en Bax como en Bak era capaz de desencadenar apoptosis. Además, agentes de estrés reticular fueron capaces de inducir un cambio en las conformaciones de Bak y Bax y su consiguiente oligomerización (Zong, Li et al. 2003).

En respuesta a estrés en el RE, las isoformas Bim^{EL} y Bim^L pueden ser fosforiladas por JNK, conllevando la liberación de las proteínas BH3-*only* del citoesqueleto y permitiendo así la ejecución de su actividad proapoptótica (Lei y Davis 2003), proceso inhibido por Bcl-X_L (Morishima, Nakanishi et al. 2004).

En el mismo estudio se ha propuesto que Bim además puede asociarse a la caspasa 12 y activarla (Morishima, Nakanishi et al. 2004). Trabajos recientes tanto *in vitro* como *in vivo* han confirmado que Bim es esencial para la apoptosis causada por agentes que inducen estrés de RE (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007). Además, este estudio ha demostrado que la activación de Bim se realiza mediante dos vías de señalización nuevas, que implican su desfosforilación por la proteína fosfatasa 2A. Esta desfosforilación impide la degradación de Bim por el proteosoma. Por tanto, la inducción de Bim es un requisito indispensable para la apoptosis mediada por señales de estrés reticular.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se sabe que tanto Puma como Noxa son inducidos transcripcionalmente en respuesta a estrés reticular. Un estudio con *microarrays* de ADNc mostró que Puma es una de las proteínas inducidas por estrés reticular prolongado (Reimertz, Kogel et al. 2003), un papel funcional que fue corroborado por un *screening* con ARN de interferencia para genes reguladores de apoptosis mediada por este tipo de estrés, en el que también se identificó Noxa como parte de esta señalización (Futami, Miyagishi et al. 2005). Estos datos además son confirmados por el hecho de que células deficientes tanto en *puma* como en *noxa* son parcialmente resistentes a apoptosis inducida por daño en el RE (Li, Lee et al. 2006).

En su conjunto, la regulación de la familia Bcl-2, bien por JNK o CHOP o por proteínas BH3-only, parece activar Bak y Bax, lo que provoca la activación de las caspasas y finalmente la ejecución de la apoptosis.

6.4.3. Otros

Se ha sugerido que la activación de Akt constituye una vía protectora iniciada durante el estrés reticular, dado que Akt se puede activar transitoriamente en respuesta a varios estímulos de estrés del RE (Hu, Han et al. 2004) y el bloqueo de Akt sensibiliza células a muerte celular mediada por este tipo de estrés.

6.4.4. Activación de caspasas durante la apoptosis inducida por estrés del RE

Mientras que la cascada de caspasas en las vías de receptores de muerte o la vía mitocondrial ha sido bien caracterizada, todavía no se ha podido establecer de modo concluyente el conjunto de caspasas relacionadas con la apoptosis inducida por estrés del RE. En diferentes estudios se ha observado el procesamiento de las caspasas 3, 6, 7, 8, 9 y 12. Aunque la activación de caspasas es un requisito para el proceso de apoptosis, todavía se desconoce la identidad de una caspasa apical en el contexto de estrés reticular. Aún así, algunos estudios han implicado a las caspasas iniciadoras caspasa 12 y procaspasa 8L en la iniciación de la señalización apoptótica en el RE.

6.4.4.1. La caspasa 12

La caspasa 12 está localizada específicamente en el RE (Nakagawa, Zhu et al. 2000), y fue propuesta como caspasa clave en el proceso de apoptosis inducido por estrés reticular (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003), pero no por otros estímulos no relacionados con el RE (Nakagawa, Zhu et al. 2000). Además, la caspasa 12 es necesaria para la muerte celular en respuesta a estímulos farmacológicos que inducen estrés de RE (Nakagawa, Zhu et al. 2000), o en respuesta a Bim dirigido a este orgánulo (Morishima, Nakanishi et al. 2004). Sin embargo, la activación de caspasa 12 por estrés reticular puede ocurrir de varias maneras. Por ejemplo, esta caspasa puede activarse por las proteasas calpaínas (Nakagawa e Yuan 2000) o autoactivarse a través de una asociación con IRE1 α y TRAF2 (Yoneda, Imaizumi et al. 2001). Una vez activada, la caspasa 12 puede ocasionar apoptosis tanto a través de la mitocondria como de una forma independiente de ella. En este último caso, la caspasa 12 proteoliza directamente la procaspasa 9 que subsiguientemente activa la caspasa 3 (Morishima, Nakanishi et al. 2002; Rao, Castro-Obregon et al. 2002) (Figura 10).

No obstante, la importancia de las vías de estrés reticular activadas por la procaspasa 12 ha sido y sigue siendo un tema de discusión activa. Por un lado, la expresión de la caspasa 12 está restringida a células murinas. En humanos el gen fue silenciado durante la evolución a causa de varias mutaciones, por lo que resulta inactivo. El parálogo más cercano en humanos es la caspasa 4, aunque su papel no se ha podido establecer de forma convincente. Por otro lado, células MEF deficientes en caspasa 12 revelaron fenotipos opuestos en estudios de dos grupos diferentes. Mientras que unos observaron que la ausencia de caspasa 12 les confiere a las células una cierta protección a estrés reticular (Nakagawa, Zhu et al. 2000), otros no detectaron ninguna resistencia (Saleh, Mathison et al. 2006).

6.4.4.2. La caspasa 8

La posible implicación de la caspasa 8 en esta vía viene sugerida por publicaciones en las que se describe que determinadas condiciones generadoras de estrés en el RE pueden inducir la activación de la caspasa 8, que a su vez activa Bid, la salida de citocromo c y la activación de caspasa 9 (Jimbo, Fujita et al. 2003).

6.4.4.3. La caspasa 2

En algunos tipos celulares la caspasa 2 está localizada en membranas reticulares y en el aparato de Golgi (Mancini, Machamer et al. 2000; Cheung, Lynn Kelly et al. 2006; Murakami, Aizu-Yokota et al. 2007). Además, se ha descrito que esta caspasa también se activa durante la apoptosis inducida por varios agentes citotóxicos como por ejemplo etopósido, cisplatino o irradiación, y que puede actuar en la cascada de señalización a un nivel superior de la mitocondria (Lassus, Opitz-Araya et al. 2002).

6.4.4.4. La procaspasa 8L y Bap31

También se ha asociado la actividad de la procaspasa 8L y la proteína Bap31 con la inducción de apoptosis a través del RE. Aunque en este contexto la implicación de señales de estrés del RE todavía no se ha estudiado en detalle, sí parece estar involucrado un tránsito de calcio del RE a la mitocondria: La procaspasa 8L es una isoforma de caspasa 8 asociada de manera periférica con la cara citosólica del RE (Breckenridge, Nguyen et al. 2002). Durante la apoptosis iniciada por el oncogén E1A, la procaspasa 8L se asocia selectivamente con Bap31, una proteína integral de membrana reticular que se une tanto a la proteína relacionada BAP29 como a Bcl-2/Bcl-X_L (Adachi, Schamel et al. 1996; Ng, Nguyen et al. 1997; Nguyen, Breckenridge et al. 2000). Este reclutamiento al complejo de Bap31 coincide con la proteólisis de la procaspasa 8L que conlleva la generación de un fragmento (p20) de Bap31. Permaneciendo insertado en el RE, p20 tiene capacidad apoptótica puesto que es capaz de inducir muerte celular cuando se expresa ectópicamente durante un tiempo prolongado (Ng, Nguyen et al. 1997). Además, la expresión de p20 mediante adenovirus induce una liberación inmediata de calcio reticular, al que sigue el reclutamiento de la proteína Drp1 (un mediador crítico de la maquinaria de fisión mitocondrial) a la mitocondria que ocasiona la fragmentación y fisión de la red mitocondrial y la liberación de citocromo c (Breckenridge, Stojanovic et al. 2003). Es interesante reseñar que también se ha visto que señales de calcio reticular regulan la reestructuración de la mitocondria durante apoptosis inducida por ceramida (Pinton, Ferrari et al. 2001) (Figura 10).

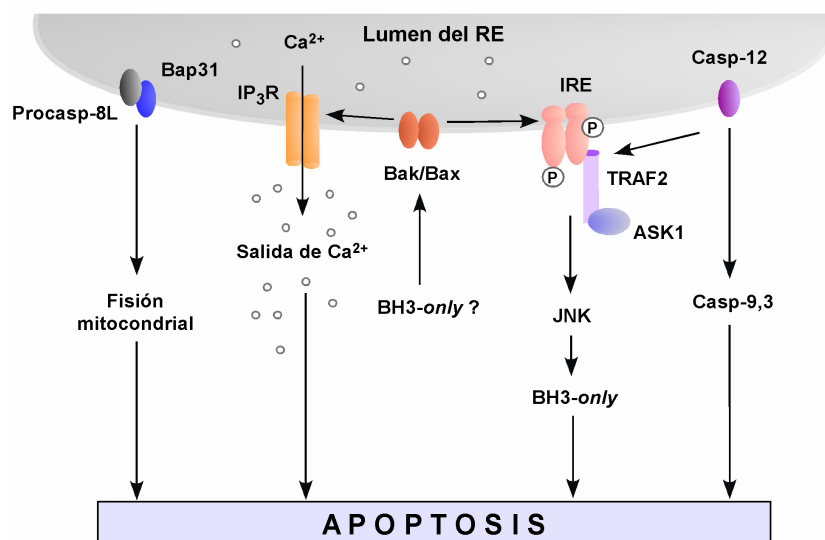
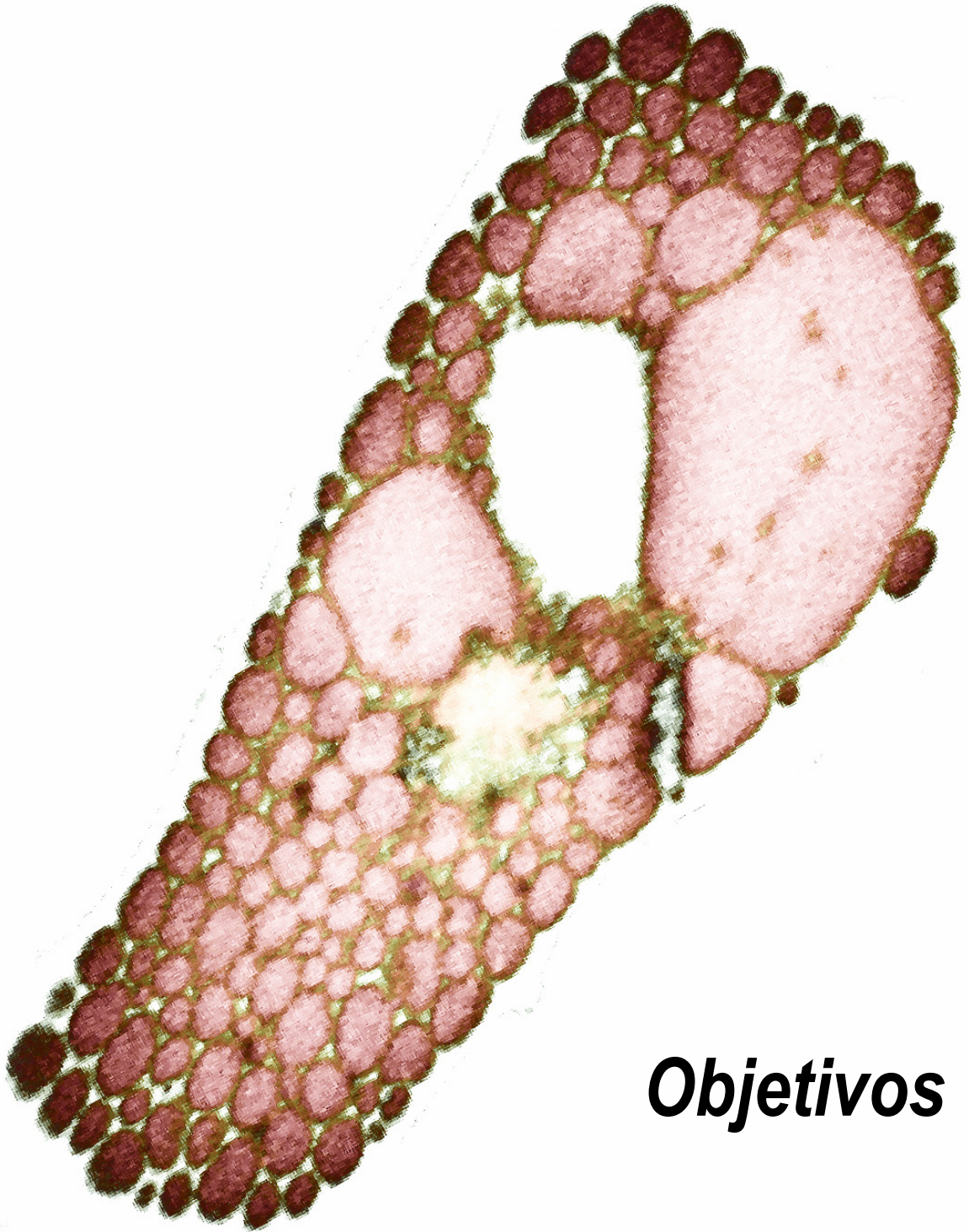


Figura 10. Algunos modelos de inducción de apoptosis desde el RE.

La enorme superficie de las membranas reticulares podría proporcionar una plataforma para el ensamblaje de complejos reguladores de caspasas. De hecho, algunas proteínas del RE ya han sido identificadas como dianas de caspasas, siendo la mayoría sustratos de la caspasa 3 (como por ejemplo las proteínas SREBP, SRP 72, IP_3R1 y 2, la chaperona GRP94, presenilinas, APP y Bap31). Por tanto, la

proteólisis de estos sustratos probablemente contribuye a la inactivación coordinada de los procesos normales de la célula durante la fase ejecutora de apoptosis (Breckenridge, Germain et al. 2003).



Objetivos

1. Identificación y estudio de nuevas actividades de Bak ausentes en su homólogo Bax
2. Estudio del papel de Bak reticular en vías de señalización apoptótica



Resultados

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA NUEVA ACTIVIDAD DE BAK AUSENTE EN EL HOMÓLOGO BAX

Como se menciona en la Introducción, los homólogos proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bak y Bax son esenciales para múltiples vías de señalización apoptótica (Cheng, Wei et al. 2001; Wei, Zong et al. 2001; Zong, Lindsten et al. 2001). Ambas proteínas presentan una alta homología en sus secuencias y, según la gran mayoría de los estudios descritos, una redundancia sustancial en sus funciones. Células deficientes en sólo uno de los genes, por ejemplo, permanecen sensibles a una gran variedad de estímulos apoptóticos, y en coherencia con esto, ratones deficientes en sólo uno de los homólogos presentan fenotipos moderados (Knudson, Tung et al. 1995; Lindsten, Ross et al. 2000), mientras que los deficientes en ambas proteínas sufren anomalías mayores (Lindsten, Ross et al. 2000). A pesar de este solapamiento funcional, recientemente también se han descrito actividades específicas de Bak o Bax que están ausentes en el homólogo correspondiente. Algunas publicaciones destacan un papel de Bax en múltiples vías apoptóticas en células humanas (Zhang, Yu et al. 2000; Theodorakis, Lomonosova et al. 2002; Gillissen, Essmann et al. 2003), mientras que otras describen un papel fundamental de Bak en la muerte celular inducida por fármacos antitumorales (Wang, Gastman et al. 2001) o granzima B (Wang, Wieckowski et al. 2001). Aparte de estas divergencias funcionales, también destacan diferencias relacionadas con la localización subcelular de las dos proteínas. En células normales, Bax es una proteína mayoritariamente citoplasmática (Suzuki, Youle et al. 2000) que cambia su localización a membranas intracelulares únicamente tras un estímulo apoptótico (Hsu, Wolter et al. 1997). Bak, por el contrario, está constitutivamente insertada en membranas subcelulares, aunque de una forma débil (Griffiths, Dubrez et al. 1999). Todo ello en su conjunto podría sugerir una regulación diferencial de las vías en las que están implicadas Bak y Bax, o la existencia de actividades biológicas únicamente desempeñadas por una de las moléculas.

1.1. IDENTIFICACIÓN DE UN FENOTIPO DE VACUOLIZACIÓN CELULAR CITOPASMÁTICA INDUCIDO POR LA COEXPRESIÓN DE BAK Y BCL-X_L

En ensayos rutinarios de sobreexpresión de Bak y Bax con varios inhibidores de apoptosis surgió una diferencia muy llamativa entre las dos proteínas cuando se bloqueó el proceso apoptótico mediante cotransfección con la proteína antiapoptótica Bcl-X_L. Esta diferencia se manifestó morfológicamente en una vacuolización del citoplasma de las células que expresaban simultáneamente Bak y Bcl-X_L, y que pudo ser detectada a través de la cotransfección con el marcador citosólico GFP. Mientras que las células transfectadas con Bax y Bcl-X_L se parecían en la distribución de GFP al cultivo control transfectado con

vector vacío (Figura 11A), se apreciaron en el cultivo que expresaba Bak y Bcl-X_L vacuolas muy pronunciadas, visualizadas a través de la exclusión de GFP (Figura 11A). Cuantificaciones posteriores revelaron que aproximadamente un 35-40% de las células transfectadas presentaban esta morfología atípica (Figura 11B). En cambio, esta alteración estaba ausente en el cultivo transfectado con Bax y Bcl-X_L (Figura 11B). Además, la presencia única de Bcl-X_L tampoco causaba este fenómeno (Figura 11B).

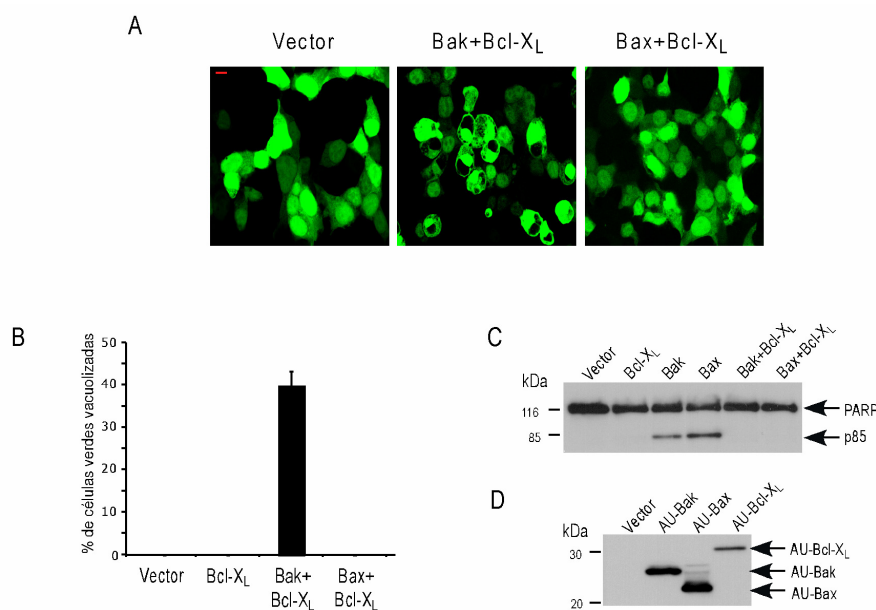


Figura 11. La coexpresión de Bak y Bcl-X_L induce vacuolización citoplasmática. (A) Análisis de la vacuolización citoplasmática inducida por Bak y Bcl-X_L mediante microscopía confocal. Células HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de los plásmidos de expresión indicados, en combinación con un plásmido que expresaba GFP citosólico. A las 36 h de la transfección se fijaron las células y se montaron para el análisis posterior. (B) Cuantificación de células con el citoplasma vacuolizado después de la transfección con Bak o Bax, en combinación con Bcl-X_L y GFP. Con este fin, se transfectaron células HEK-293T como en (A), y a las 36 h se determinó el porcentaje de células que expresaban GFP y al mismo tiempo mostraron un nivel detectable de vacuolización. Para ello, se contaron un total de al menos 400 células verdes. Los datos se representan como porcentajes de células que expresaban GFP y que mostraron al mismo tiempo el citoplasma vacuolizado con respecto al total de células verdes. Las barras de error representan las desviaciones estándar obtenidas al contar al menos 8 campos diferentes. (C) Bcl-X_L inhibe en la misma medida la apoptosis inducida por Bak y Bax. Células HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de los plásmidos de expresión indicados y 24 h después se lisaron, y cantidades iguales de proteínas se sometieron a *western blot*, usando un anticuerpo monoclonal anti-PARP. (D) AU-Bak y AU-Bax se expresan a niveles comparables. Células HEK-293T fueron transfectadas de modo similar que en la Figura 11C, excepto que se usó adicionalmente un plásmido que codificaba el inhibidor viral de caspasas p35 para bloquear la apoptosis. 24 h después de la transfección las células fueron lisadas y cantidades iguales de proteína fueron analizadas por *western blot*, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AU.

Para descartar que la diferencia entre Bak y Bax en el potencial de inducir vacuolas fuera debida a una capacidad desigual de Bcl-X_L para inhibir apoptosis, se hicieron análisis de *western blot* utilizando un anticuerpo frente a la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP, del inglés *poly-ADP-ribose polymerase*), el substrato más común de la caspasa 3. En estos ensayos, el procesamiento proteolítico de PARP fue inhibido en igual medida en ambos casos (Figura 11C), indicando que Bcl-X_L efectivamente inhibe la apoptosis inducida por tanto Bak como Bax. Además, tampoco se detectaron diferencias significativas en

los niveles de expresión de Bak y Bax, diferencias que hubieran podido explicar este fenómeno (Figura 11D).

1.1.1. Experimentos de tiempo-respuesta y cuantificación del porcentaje de células que mostraban el citoplasma vacuolizado

Para determinar el momento de la aparición más temprana de las vacuolas con respecto a la transfección se realizaron experimentos de tiempo-respuesta. Estos ensayos mostraron que el efecto de vacuolización fue observado por primera vez entre las 12 y 16 h tras la transfección (Figura 12), y alcanzó su punto máximo en torno a las 36 h (Figura 12). En cambio, en ningún momento este fenotipo estuvo presente en células cotransfectadas con Bax y Bcl-X_L.

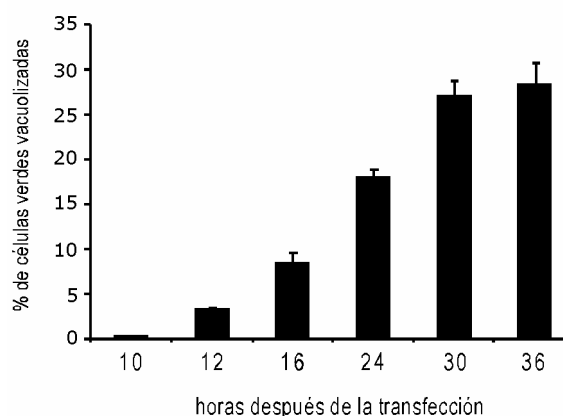


Figura 12. Estudio tiempo-respuesta de la vacuolización inducida por la coexpresión de Bak y Bcl-X_L. Células HEK-293T se transfectaron con Bak, Bcl-X_L y GFP, y se trataron posteriormente como se describe en la Figura 11A. Se analizaron las células a los tiempos indicados tal y como se describe en la Figura 11B.

1.1.2. Determinación del fenotipo de vacuolización en varias líneas celulares

Para excluir que la inducción de esta morfología fuera exclusiva de la línea celular HEK-293T usada, se llevaron a cabo transfecciones adicionales de células Cos-7 y HeLa. Estos ensayos evidenciaron que la capacidad de Bak y Bcl-X_L de causar vacuolas era independiente del tipo celular, dado que todas las líneas celulares eran igualmente susceptibles (Figura 13). La tinción nuclear con DAPI reveló además la presencia de al menos una vacuola destacada, que habitualmente estaba situada en contacto próximo con la periferia del núcleo (Figura 13). En cambio, la ausencia del fenotipo tras la transfección con Bax y Bcl-X_L confirmó que esta proteína era también incapaz de causar el fenotipo de vacuolización en otras líneas celulares.

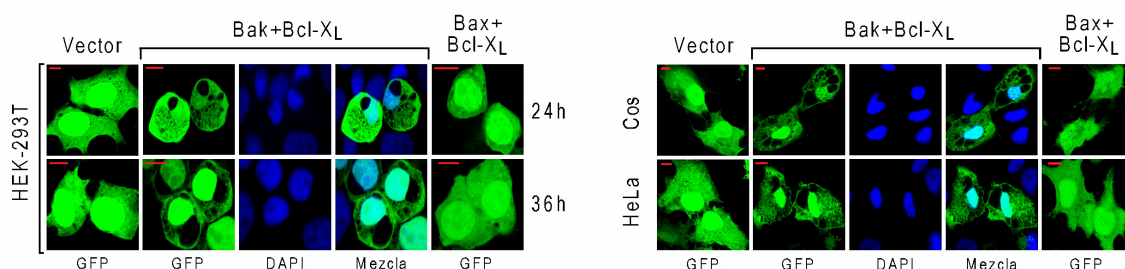


Figura 13. Análisis mediante microscopía confocal de la vacuolización citoplasmática inducida por Bak y Bcl-X_L en diferentes líneas celulares. Las células HEK-293T, HeLa y Cos-7 fueron transfectadas como se describe en la Figura 11A. Las células se fijaron, bien a las 24 h (HEK-293T, como se indica), bien a las 36 h (HEK-293T, HeLa y Cos-7, como se indica). Posteriormente se tiñeron con DAPI y se montaron para su análisis.

1.2. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA MAQUINARIA EJECUTORA DE APOPTOSIS (CASPASAS) Y LA INHIBICIÓN DE MUERTE CELULAR EN LA GENERACIÓN DEL FENOTIPO

1.2.1. El bloqueo de la apoptosis inducida por Bak mediante inhibidores alternativos a Bcl-X_L no es suficiente para revelar la vacuolización

Se sabe que la sobreexpresión de Bak provoca la muerte de la célula (Chittenden, Harrington et al. 1995), por lo cual la generación de vacuolas citoplasmáticas podría ser un fenómeno simultáneo a la muerte celular, pero normalmente oculto por la actividad apoptótica dominante de Bak. En este sentido, Bcl-X_L cotransfectado revelaría este fenotipo simplemente al inhibir la muerte celular y, por tanto, Bak sobreexpresado podría inducir la vacuolización en presencia de inhibidores apoptóticos alternativos a Bcl-X_L. Para comprobar esta hipótesis se transfectaron células HEK-293T con Bak junto con, bien un inhibidor genético de caspasas p35 (Clem, Fechheimer et al. 1991; Zhou, Krebs et al. 1998; Rabizadeh, Xavier et al. 2004), un dominante negativo de la caspasa 9 (C9.DN, (Rabizadeh, Xavier et al. 2004)), o bien en presencia del inhibidor comercial de caspasas z-VAD-fmk. Sin embargo, la presencia de los diferentes inhibidores no fue suficiente para revelar el fenotipo en células transfectadas con Bak (Figura 14A), aunque todos los inhibidores bloquearon el procesamiento proteolítico de PARP (y, por tanto, apoptosis) en la misma medida que Bcl-X_L, y la expresión de Bak era homogénea en todas las condiciones estudiadas (Figura 14B). Por tanto, estos resultados indican que la inhibición de apoptosis es insuficiente para generar el fenómeno de vacuolización, y que Bcl-X_L ejerce una función adicional además de bloquear la actividad proapoptótica.

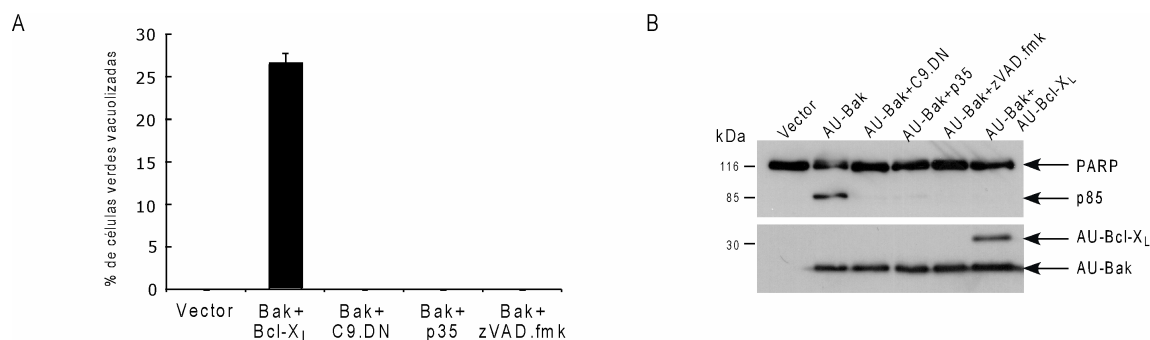


Figura 14. La inhibición de la apoptosis inducida por Bak no es suficiente para revelar la vacuolización citoplasmática. (A) Cuantificación de células vacuolizadas después de la transfección con Bak en presencia de diferentes inhibidores de apoptosis. Se transfectaron células HEK-293T tal y como se describe en la Figura 11C, aunque además se introdujo, o bien un plásmido con una versión dominante-negativa de caspasa 9 (C9.DN), o bien de p35, un inhibidor viral de caspasas. Donde está indicado, se usó el inhibidor comercial de caspasas z-VAD-fmk (100µM) que se añadió 1 h después de la transfección. Los contejes de la vacuolización citoplasmática se realizaron como en la Figura 11B. (B) Los inhibidores de muerte que eran incapaces de revelar la vacuolización bloquean la apoptosis inducida por Bak en la misma medida que Bcl-X_L. Células HEK-293T se transfectaron con una mezcla de los plásmidos indicados. En los cultivos relevantes se añadió z-VAD-fmk (100µM) 1 h tras la transfección, y en todos los casos se lisaron las células 24 h tras la transfección. Se muestran análisis mediante *western blot* usando los anticuerpos anti-PARP (parte superior) y anti-AU (parte inferior), este último para confirmar la homogeneidad de la transfección.

1.2.2. El fenotipo de vacuolización causado por Bak y Bcl-X_L es independiente de la actividad caspasa

El hecho de que los inhibidores de caspasas sean incapaces de generar el fenotipo podría indicar también que las caspasas son necesarias para generar la vacuolización. Al objeto de comprobar esta idea, se llevaron a cabo experimentos de inhibición de caspasas en células que coexpresaban Bak y Bcl-X_L. Sin embargo, el bloqueo de estas proteasas no redujo el porcentaje de células vacuolizadas de una manera significativa (Figura 15), lo que descarta un papel de las caspasas en el fenómeno observado.

En su conjunto, todos los datos mostrados hasta ahora manifiestan que Bak normalmente carece de la capacidad de inducir la vacuolización citoplasmática, y sugieren la necesidad de un paso de activación proporcionado por Bcl-X_L para inducir el fenómeno de vacuolización de una manera independiente de caspasas.

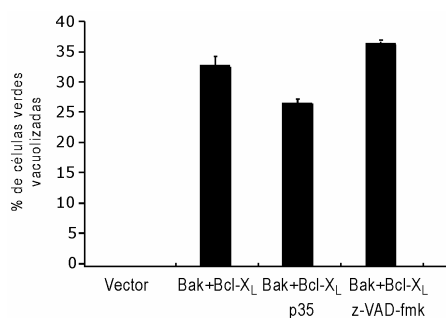


Figura 15. Las caspasas no son necesarias para la inducción de vacuolización causada por Bak y Bcl-X_L. Cuantificación de células que muestran vacuolización citoplasmática después de la transfección con Bak y Bcl-X_L en presencia de diferentes inhibidores de apoptosis. Para ello, se transfectaron y se trataron células HEK-293T como en la Figura 14A, y se cuantificaron como en la Figura 11B.

1.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE BAK IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE LA VACUOLIZACIÓN

1.3.1. Una versión de Bak carente del dominio BH3 retiene la capacidad de inducir el fenotipo de vacuolización en ausencia de Bcl-X_L

Dado que se sabe que Bcl-X_L se puede unir al dominio BH3 de Bak y Bax e inhibir así sus actividades proapoptóticas (Chittenden, Flemington et al. 1995; Simonen, Keller et al. 1997), nos planteamos la pregunta de si la capacidad de Bcl-X_L de revelar el potencial vacuolizador de Bak podría implicar la inhibición del dominio BH3 de Bak. Para evaluar esta posibilidad se construyó una versión de Bak carente del dominio BH3 (BakΔBH3, ver Materiales y Métodos) y se evaluó su capacidad de inducir el fenómeno observado en ausencia de Bcl-X_L. Experimentos de transfección efectivamente indicaron que este mutante de Bak era suficiente para provocar la vacuolización citoplasmática autónomamente (Figura 16A).

Ensayos de cuantificación comparativa mostraron que el porcentaje de células vacuolizadas tras la transfección con BakΔBH3 era sólo ligeramente menor al que mostraron las células transfectadas con Bak y Bcl-X_L (Figura 16B). Para verificar el nivel de expresión de las versiones Bak y BakΔBH3 se llevaron a cabo análisis de *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal frente al epítipo AU, y estos ensayos indicaron una expresión homogénea de las dos versiones de Bak (Figura 16C).

Estos datos, en su conjunto, confirman que Bak, y no Bcl-X_L, es la molécula activa en este contexto, y además sugieren que Bcl-X_L revela esta función a través de la unión e inactivación del dominio BH3 de Bak.

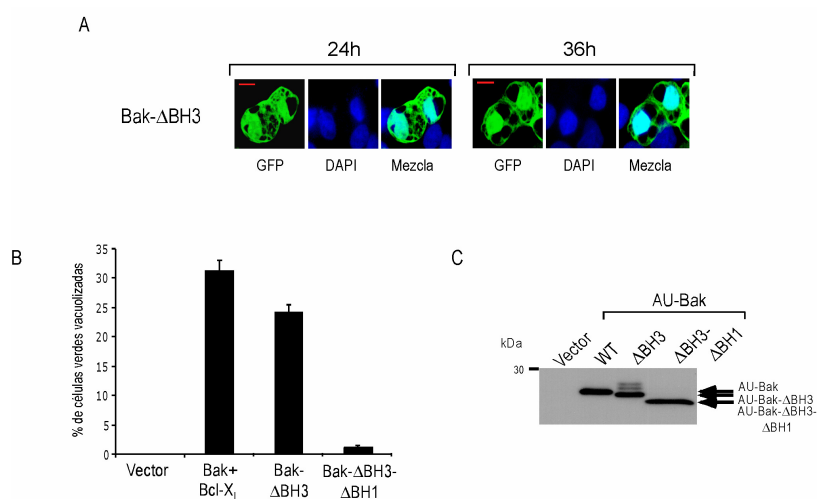


Figura 16. Una versión de Bak carente del dominio BH3 induce vacuolización citoplasmática en ausencia de Bcl-X_L cotransfectado. (A) Análisis de la vacuolización citoplasmática inducida por la expresión de BakΔBH3 mediante microscopía confocal. HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de los plásmidos que expresan BakΔBH3 y GFP. 24 h ó 36 h (según se indica) después, las células fueron fijadas, montadas y analizadas. (B) Cuantificación de la vacuolización inducida por BakΔBH3 o BakΔBH3ΔBH1. Células HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de los plásmidos indicados, junto con un plásmido que expresa GFP. 36 h más tarde se determinó el porcentaje de células vacuolizadas que al mismo tiempo expresaban GFP, tal y como se describe en la Figura 11B. (C) AU-Bak, AU-BakΔBH3 y AU-BakΔBH3ΔBH1 se

expresan a niveles comparables. HEK-293T fueron transfectadas, lisadas y procesadas como en la Figura 11D. Se presenta el análisis de *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AU.

1.3.2. Un mutante de Bak carente de los dominios BH3 y BH1 es incapaz de provocar el fenotipo de vacuolización

Como se describe en la Introducción, Bak dispone, además del dominio BH3, de los dominios BH1 y BH2. Con el fin de determinar la relevancia del dominio BH1 de Bak en la generación de vacuolas, se construyó una versión de Bak que carecía, además del dominio BH3, de la secuencia correspondiente al dominio BH1 (Bak Δ BH3 Δ BH1, ver Materiales y Métodos). Esta delección adicional bloqueó la capacidad de Bak Δ BH3 de inducir el fenómeno de vacuolización (Figura 16B), mientras que no existían diferencias ni en el nivel de expresión de Bak Δ BH3 Δ BH1 (Figura 16C) ni en la distribución intracelular con respecto a Bak Δ BH3 (datos no mostrados). Este resultado podría apuntar a un papel relevante del dominio BH1 de Bak en la inducción del fenotipo.

1.4. ESTUDIO DEL ORIGEN SUBCELULAR DE LA VACUOLIZACIÓN

1.4.1. Construcción de RFP reticular como marcador genético del RE

Para determinar el origen subcelular de las vacuolas quisimos comprobar en primer lugar si las vacuolas estaban topológicamente relacionadas con las cisternas del RE, ya que se ha descrito que la dilatación del RE se asocia con frecuencia a diferentes modalidades de muerte celular (Van Cruchten y Van Den Broeck 2002). Con este fin, generamos una versión de RFP dirigida al lumen de este orgánulo (reRFP, ver Materiales y Métodos). Para establecer la localización reticular de esta construcción se transfectaron células HEK-293T y, mediante IF con un anticuerpo frente al marcador reticular calreticulina, se visualizó que la reRFP colocalizaba completamente con el RE en células normales (Figura 17).

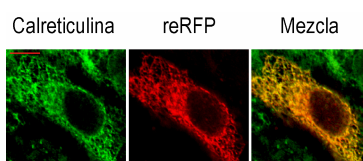


Figura 17. Colocalización de reRFP con calreticulina endógena. Células HEK-293T fueron transfectadas con un plásmido que codifica una versión de RFP dirigida al RE (reRFP). 48 h más tarde se fijaron y se tiñeron las células con un anticuerpo anti-calreticulina, seguido de un anticuerpo conjugado a Alexa 488 (verde). El análisis se efectuó mediante microscopía confocal.

1.4.2. La vacuolización citoplasmática es RE dilatado

Una vez comprobada la funcionalidad de la reRFP, se quiso determinar la relación entre las vacuolas y el RE. Con este fin, se efectuaron transfecciones de Bak y Bcl-X_L o Bak Δ BH3 solo, en combinación con GFP y reRFP. Experimentos en varias líneas celulares mostraron que las vacuolas

inducidas se presentaban completamente rellenas de reRFP (Figura 18). A tiempos tempranos del proceso de dilatación se pudo observar que gran parte del RE permaneció inalterada, pero que en el transcurso del tiempo con respecto al momento de la transfección la práctica totalidad del RE se incorporaba progresivamente a las estructuras vacuolizadas (Figura 18). En conclusión, por tanto, estos resultados establecen claramente el origen reticular de las vacuolas y además revelan el potencial de Bak en la regulación de la estructura del RE. Dado que las vacuolas muy a menudo pueden ocupar un área importante de la célula, su generación implica probablemente un proceso de dilatación, aunque tampoco se puede descartar la contribución de un fenómeno de fusión de los túbulos reticulares.

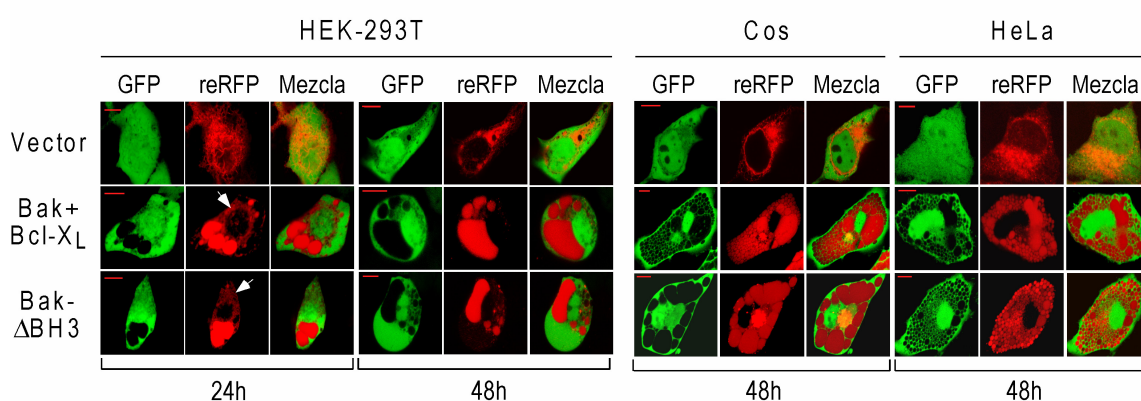


Figura 18. Las vacuolas citoplasmáticas inducidas por Bak y Bcl-X_L, o Bak Δ BH3 son cisternas del RE dilatadas. Células HEK-293T, Cos-7 y HeLa fueron transfectadas con las construcciones indicadas, junto con plásmidos que expresan GFP y reRFP. 24 h (HEK-293T, como se indica), ó 48 h (HEK-293T, Cos-7 y HeLa) después de la transfección se analizaron las células *in vivo* mediante microscopía confocal. El uso de células vivas se debió a que la fluorescencia de reRFP es sensible a la fijación y al procesamiento de las células. Las flechas blancas indican las cisternas reticulares que permanecían normales en células HEK-293T a tiempos tempranos. La figura muestra que las vacuolas inducidas por la transfección de Bak y Bcl-X_L, o Bak Δ BH3 solo, están llenas de reRFP coexpresado.

1.5. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE BAK CAUSANTE DE LA VACUOLIZACIÓN

1.5.1. Las moléculas inductoras del fenotipo están localizadas físicamente en los márgenes de las vacuolas

Dado que ya habíamos especificado que la vacuolización es inducida por Bak y no por Bcl-X_L, y, además, que el origen subcelular de las vacuolas era reticular, nos interesaba saber si el efecto de generación de vacuolas iniciado por Bak era directo (es decir, si había una relación física entre la molécula efectora y el fenotipo inducido), o si Bak señalizaba a otras proteínas que finalmente provocaran la dilatación del orgánulo.

Con objeto de determinar si el efecto de dilatación reticular se asociaba con la presencia de Bak en proximidad a las vacuolas, se hicieron estudios de IF. Para ello, se usaron versiones etiquetadas con

AU de Bak, Bak Δ BH3 y Bcl-X_L con objeto de analizar la localización de cada una específicamente. El uso de un anticuerpo anti-AU para la tinción de células transfectadas con AU-Bak en combinación con Bcl-X_L no etiquetado, o AU-Bak Δ BH3 solo, dejó ver que las vacuolas estaban recubiertas muy a menudo con un patrón punteado reconocible por el anticuerpo anti-AU (Figura 19), de forma particularmente obvia en zonas de aposición directa con el núcleo (Figura 19). Además, una variante del mismo experimento mostró una distribución parecida de Bcl-X_L (Figura 19).

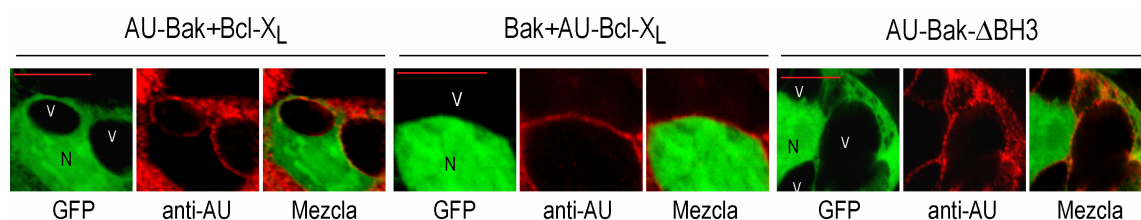


Figura 19. Localización perivacuolar de AU-Bak, AU-Bcl-X_L y AU-Bak Δ BH3. Se transfectaron células HEK-293T con GFP y las construcciones indicadas. A las 36 h de la transfección se fijaron y se tiñeron las células mediante IF con un anticuerpo anti-AU, seguido de un anticuerpo conjugado a Cy3 (rojo), y se montaron para el análisis por microscopía confocal. N indica los núcleos, V las vacuolas.

Estos resultados indican la existencia de una relación física entre las moléculas efectoras y el RE dilatado, y sugieren que la población de Bak, físicamente localizada en el RE, podría ser la causante de la morfología inducida.

1.5.2. La subpoblación de Bak en el RE retiene la capacidad de provocar la vacuolización

Se ha descrito que en condiciones fisiológicas Bak está localizado en membranas subcelulares a través de su dominio transmembrana C-terminal (Youle y Strasser 2008). Aunque la mayoría de la proteína se sitúa en la membrana exterior de la mitocondria (~75 %), en menor medida (~15 %) también está presente en el RE (Nutt, Pataer et al. 2002; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003). Al objeto de reforzar la hipótesis de una relación topológica entre las moléculas inductoras y el fenotipo causado, y de determinar la población subcelular de Bak causante de la vacuolización, se llevaron a cabo experimentos en los que Bak Δ BH3 se dirigió selectivamente a diferentes compartimentos subcelulares.

La versión reticular de Bak Δ BH3 se construyó a través de la sustitución del dominio transmembrana de Bak Δ BH3 (C-terminal) por la región transmembrana del citocromo b 5 (Bak Δ BH3-cb5, ver Materiales y Métodos). El citocromo b 5 es una proteína de membrana de tipo *tail-anchor* que está localizada en el RE. La secuencia responsable para la inserción selectiva en el RE está localizada en el C-terminal de la proteína y su capacidad de dirigir proteínas predominantemente a membranas reticulares ha sido descrita en varios estudios (Zong, Li et al. 2003). Ensayos de colocalización con calreticulina mostraron que Bak Δ BH3-cb5 efectivamente estaba localizado en las membranas reticulares (Figura 20A). Esta versión de Bak Δ BH3 fue capaz de retener completamente la capacidad de vacuolización (Figura 20B), mientras que una forma de Bak Δ BH3 fusionada con el péptido ActA (Bak Δ BH3-ActA, ver Materiales

y Métodos), cuya capacidad de dirigir proteínas a la mitocondria se había descrito anteriormente (Zhu, Cowie et al. 1996), mostró una actividad disminuida (Figura 20B). Ensayos control de IF frente al marcador del RE calreticulina indicaron que un porcentaje de Bak Δ BH3-ActA estaba no solamente presente en las mitocondrias, sino sorprendentemente también en membranas reticulares. Estos resultados indican que ActA es incapaz de dirigir completamente a Bak hacia las membranas mitocondriales, y sugieren que Bak podría tener señales de localización reticular adicionales que serían capaces de anular ActA. Debido a esta localización parcial en el RE, no es de esperar que Bak Δ BH3-ActA sea completamente incapaz de inducir la dilatación del RE, incluso si sólo Bak reticular fuera activo en este contexto. En cambio, la localización de la quimera cb5 era enteramente reticular (Figura 20A).

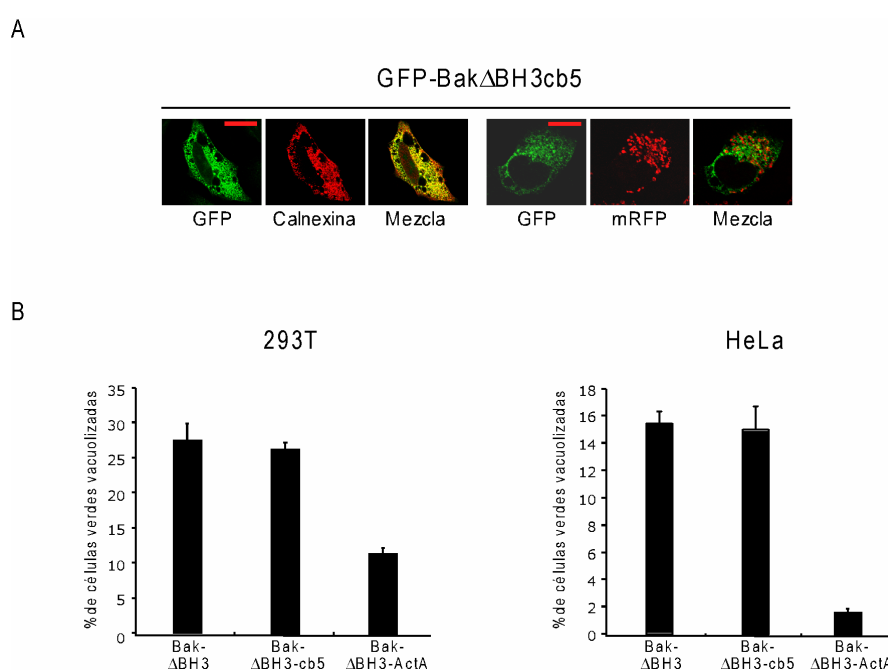


Figura 20. Bak Δ BH3 específicamente localizado en el RE induce vacuolización citoplasmática. (A) La localización de Bak Δ BH3cb5 es enteramente reticular. Se transfectaron células HEK-293T con el plásmido GFP-Bak Δ BH3cb5 y, o bien se tiñeron con un anticuerpo anti-calnexina, o bien se usó el marcador genético mitocondrial mRFP. A las 36 h se analizaron las células mediante microscopía confocal. (B) Bak Δ BH3-cb5 retiene la capacidad de inducir la dilatación del RE, mientras que Bak Δ BH3-ActA presenta una actividad disminuida. Células HEK-293T y HeLa fueron transfectadas con los plásmidos indicados y GFP. Para reducir la muerte celular se añadió z-VAD-fmk (100 μ M) una hora tras la transfección, y a las 36 h se cuantificó la vacuolización citoplasmática como se describe en la Figura 11B.

En conclusión, estos resultados subrayan aún más la idea de que la capacidad de Bak de inducir la vacuolización está relacionada con su presencia física en el RE.

1.6. RELEVANCIA DEL CALCIO EN LA INDUCCIÓN DEL FENOTIPO

Se ha visto en algunos estudios que niveles altos de calcio en el citoplasma pueden inducir la compartimentalización y vacuolización del RE (Subramanian y Meyer 1997), señalando un papel del calcio en la regulación de la estructura del RE. Además, tal y como se describe en la Introducción, algunos miembros de la familia Bcl-2 son capaces de alterar la homeostasis del calcio del RE (Nutt, Chandra et al. 2002; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003). Teniendo en cuenta estos estudios previos, la dilatación del RE inducida por Bak en nuestro sistema podría estar relacionada con una función del calcio.

1.6.1. Implicación de los canales de calcio RyR en la generación de las vacuolas

Con el fin de comprobar esta hipótesis, nos centramos en el posible papel de los canales de calcio que facilitan la salida del ión desde las cisternas reticulares al citoplasma. Para ello, se usaron los compuestos dantrolina y cafeína. Dantrolina es un fármaco comercial y relajante muscular que tiene como base molecular la disminución de concentraciones de calcio intracelular a través de la inhibición directa de los receptores rianodina (RyR) (Zhao, Li et al. 2001; Fill y Copello 2002), que, junto con los receptores IP₃R (del inglés *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*) (Foskett, White et al. 2007), son los dos canales encargados de la liberación de calcio del orgánulo. La presencia de dantrolina durante la expresión de Bak y Bcl-X_L, o Bak Δ BH3 solo, tuvo el efecto inesperado de exagerar el fenotipo de vacuolización (Figura 21). En presencia de dantrolina, las vacuolas tendieron a ocupar la mayor parte del espacio citoplasmático, mientras que en su ausencia eran habitualmente más pequeñas (Figura 21).

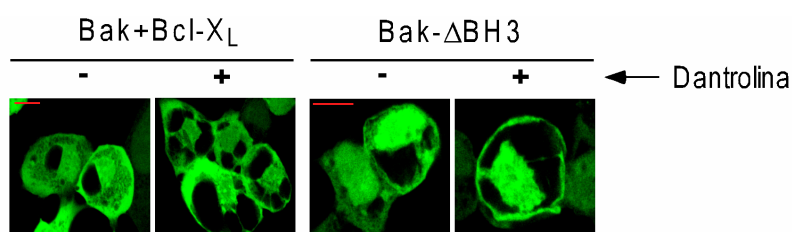


Figura 21. Implicación de los canales de calcio RyR en la regulación de la vacuolización citoplasmática inducida por Bak. El tratamiento con dantrolina potencia el tamaño de las vacuolas. Células HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de los plásmidos indicados, junto con GFP. Donde está indicado se añadió dantrolina (50 μ M) 1 h después de la transfección, y 35 h más tarde se fijaron, montaron y analizaron las células mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. Se usó el mismo aumento tanto para células control como células tratadas.

Por el contrario, no se observó ningún cambio inducido por dantrolina en el citoplasma de células cotransfectadas con Bax y Bcl-X_L, ni en aquellas transfectadas con Bak o Bax en presencia de los inhibidores apoptóticos p35, o una versión dominante negativa de la caspasa 9. Esto sugiere que dantrolina solamente muestra un efecto en presencia de un estímulo de vacuolización subyacente.

Los resultados obtenidos con dantrolina argumentan que los cambios reticulares observados son parcialmente contrarrestados por la actividad de los canales RyR. Si este modelo es cierto, la activación de los RyR debería provocar una reducción del tamaño de vacuolas. Con el fin de analizar esta posibilidad, se transfectaron células bien con la combinación de Bak y Bcl-X_L, o bien con BakΔBH3 solo, y posteriormente se trataron con cafeína, que entre muchos otros efectos celulares activa los canales RyR, conllevando la liberación de calcio de los depósitos del RE (Ozawa 2001). En estos experimentos la cafeína efectivamente indujo la reducción rápida del tamaño de vacuolas, dando como resultado un número menor de células que representaban un fenotipo detectable (Figura 22).

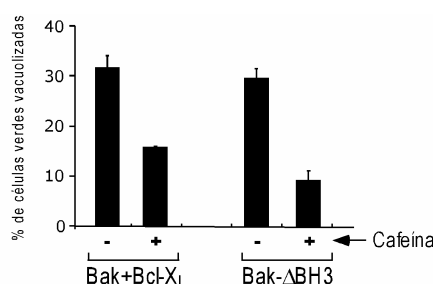


Figura 22. Implicación de los canales de calcio RyR en la regulación de la vacuolización citoplasmática inducida por Bak. El tratamiento con cafeína reduce la vacuolización. Células HEK-293T se transfectaron como se describe en la Figura 21. 36 h más tarde se trataron con cafeína (20mM) durante 3,5 h, tras lo cual se fijaron y se montaron para su análisis posterior. La cuantificación de células vacuolizadas se realizó como en la Figura 11B.

Resumidamente, se puede decir que estos resultados apoyan un papel de los canales de calcio RyR en la regulación de los cambios estructurales del RE inducidos por Bak, y como consecuencia, sugieren la participación de calcio.

1.6.2. Comparación de los niveles de calcio del RE dilatado frente a RE normal

Al objeto de comprobar si el fenómeno de vacuolización observado correlacionaba con cambios en la concentración reticular de calcio, se compararon las concentraciones de calcio de RE dilatado con respecto al RE inalterado. Para ello, se cotransfectaron células con Bak y Bcl-X_L en presencia de un indicador genético de calcio dirigido al RE (reYC3.3, ver Materiales y Métodos, (Miyawaki, Llopis et al. 1997)), y de RFP para identificar células vacuolizadas. El marcador YC3.3 responde a cambios de concentraciones de calcio mediante la modificación de sus propiedades espectrales debido a una transferencia de energía de fluorescencia intramolecular (FRET, ver Materiales y Métodos, (Miyawaki, Llopis et al. 1997)). Mediciones mediante microscopía confocal (ver Materiales y Métodos) revelaron que las intensidades FRET dentro de RE dilatado eran similares a aquellas presentes en cisternas reticulares normales presentes en células vecinas transfectadas (Figura 23A, panel superior y central). También se

obtuvieron niveles de FRET comparables cuando se cotransfectó el “reportero” reYC3.3 con un vector irrelevante (Figura 23A, panel inferior).

Con el fin de comprobar la funcionalidad del marcador genético reYC3.3, se trataron células simultáneamente con EGTA y TG, agentes que provocan la depleción del calcio reticular. El tratamiento con estos agentes redujo las intensidades FRET tanto de RE dilatado como de RE normal (Figura 23B), confirmando la capacidad de reYC3.3 de detectar cambios de calcio.

En su conjunto, los resultados indican que las concentraciones de calcio de RE dilatado son similares a las presentes en cisternas reticulares inalteradas. Esto implica que las células con el RE dilatado, que presentan un aumento del volumen del orgánulo, han sido capaces de mantener la concentración fisiológica de calcio reticular, posiblemente a través de un suministro de calcio del exterior celular. La falta de correlación entre la dilatación reticular y los cambios de niveles de calcio argumenta en contra de una participación directa del calcio en este fenómeno. Sin embargo, los datos de dantrolina y cafeína, que sí muestran un efecto, sugieren un modelo en el que la remodelación del RE inducida por Bak es contrarrestado por el calcio citosólico específicamente movilizado por los canales RyR.

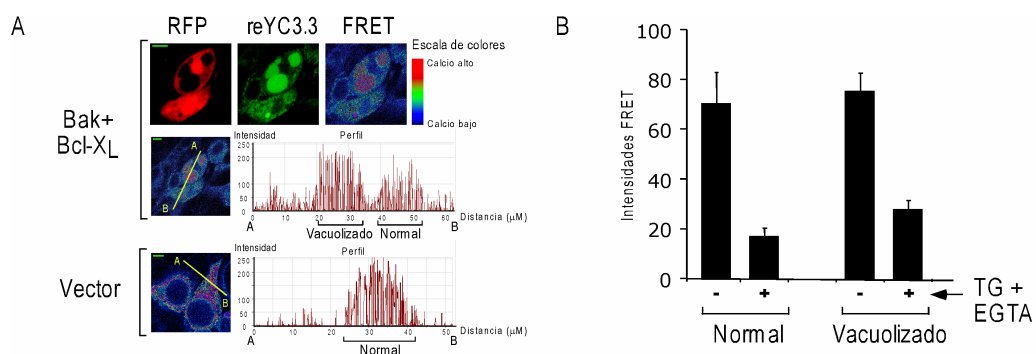


Figura 23. Comparación de las concentraciones de calcio presentes en el RE dilatado y el RE normal. (A) RE dilatado y RE normal muestran concentraciones similares de calcio. HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados, en presencia de RFP citosólico y del indicador ratiométrico de calcio reticular reYC3.3. A las 36 h tras la transfección, se analizaron las células *in vivo* mediante microscopía confocal para obtener las intensidades FRET de reYC3.3. En el panel superior, en primer lugar se usó RFP para localizar una célula vacuolizada en proximidad a una célula vecina no vacuolizada con un nivel similar de transfección. Posteriormente, se obtuvieron los coeficientes de emisión FRET (535nm/480nm) para ambas células. Se muestran las emisiones en rojo (RFP), en verde (reYC3.3, 535nm) y los coeficientes FRET. El panel del centro muestra el perfil de intensidades FRET de las mismas células a lo largo de la línea amarilla indicada a la izquierda, que incluye tanto RE vacuolizado (vacuolizado), como no vacuolizado (normal). El panel inferior muestra un perfil de intensidades reticulares de FRET de una célula transfectada con un vector irrelevante que presenta niveles similares de expresión de reYC3.3 (medido por la emisión a 535nm; no mostrado). Este panel demuestra que las células control presentan intensidades de FRET (y por tanto de calcio) parecidas a las células vacuolizadas, mostradas en el panel superior (B) El tratamiento con TG y EGTA reduce las intensidades de FRET medidas por reYC3.3 tanto en el RE dilatado como en el inalterado. Células HEK-293T fueron cotransfectadas con Bak, Bcl-X_L y reYC3.3. A las 36 h de la transfección, se analizaron tanto células con RE vacuolizado (vacuolizado), como RE no vacuolizado (normal) *in vivo* para obtener los niveles FRET del RE. Tras capturar las imágenes FRET para cada célula no tratada, se añadieron EGTA (2mM) y TG (200µM) simultáneamente al cultivo, y transcurridos 15 min, se adquirieron las imágenes FRET de nuevo. En este momento se obtuvo el efecto máximo. Para la presentación de los datos, se obtuvieron los valores medios de las intensidades FRET de una sección de RE para cada célula en condiciones control y tratadas, mostrando al menos 5 células analizadas en cada condición experimental, junto con las desviaciones estándar correspondientes.

1.7. IDENTIFICACIÓN DE ACTIVADORES DE BAK CAPACES DE INICIAR EL FENOTIPO

1.7.1. Las proteínas BH3-only Bim_{EL} y tBid inducen vacuolas citoplasmáticas

Tal y como se detalla en la Introducción, Bak y Bax son fisiológicamente activados por proteínas BH3-only, como por ejemplo Bim o Bid (Bouillet y Strasser 2002). Con el fin de explorar la existencia de una cascada de señalización encargada de regular la conformación del RE, hemos evaluado si estos activadores fisiológicos de Bak son capaces de generar el fenotipo vacuolizado en nuestro sistema. Para ello, se transfectaron células con plásmidos que expresaban, bien la proteína Bim_{EL} (O'Connor, Strasser et al. 1998), o bien una versión truncada de Bid (tBid) constitutivamente activa (Li, Zhu et al. 1998). La coexpresión de Bim_{EL} o tBid con Bcl-X_L indujo un porcentaje bajo, pero detectable (~1%), de células que mostraban vacuolización citoplasmática, lo cual sugiere una dilatación reticular incipiente. Dado que nuestros datos previos indican que dantrolina actúa como potenciador del efecto de dilatación en experimentos anteriores (Figura 21), nos planteamos la pregunta de si la presencia de este compuesto pudiera potenciar este efecto débil y provocar un fenotipo vacuolizado más fácil de detectar. Y, efectivamente, la presencia de dantrolina desde el principio de la transfección de Bim_{EL} o tBid en combinación con Bcl-X_L resultó en un porcentaje sustancial de células vacuolizadas (Figura 24), mientras que en ausencia de Bcl-X_L ambas moléculas indujeron un fenotipo mucho más moderado (Figura 24).

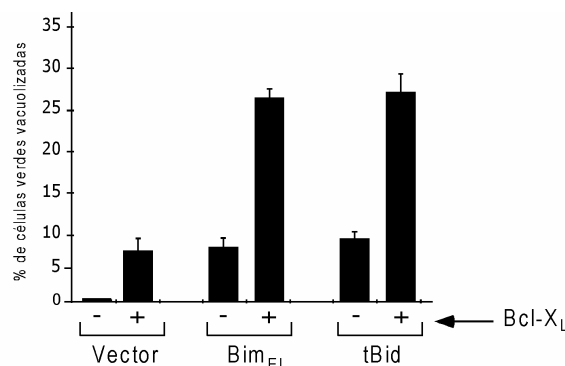


Figura 24. Cuantificación de células transfectadas con Bim_{EL} y tBid que muestran vacuolización citoplasmática en presencia de dantrolina, como función de la coexpresión de Bcl-X_L. HEK-293T fueron transfectadas con una mezcla de las construcciones indicadas, en presencia de plásmidos que expresan GFP y el inhibidor de apoptosis p35. Se añadió dantrolina (50µM) 1 h después de la transfección a todos los puntos experimentales. El porcentaje de células que expresaban GFP y mostraban vacuolización citoplasmática se determinó a las 36 h de la transfección, tal y como se describe en la Figura 11B.

1.7.2. La vacuolización causada por Bim_{EL} y tBid es de origen reticular

Para determinar si las vacuolas inducidas por las proteínas BH3-only provenían del mismo compartimento subcelular que el fenotipo causado por Bak y Bcl-X_L, se realizaron experimentos de cotransfección con reRFP, que efectivamente confirmaron el origen reticular de las vacuolas inducidas (Figura 25).

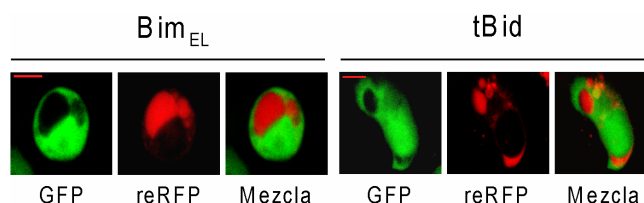


Figura 25. La coexpresión de Bim_{EL} o tBid con Bcl-X_L induce la dilatación del RE en presencia de dantrolina. HEK-293T fueron transfectadas con plásmidos que expresaban, bien Bim_{EL} o tBid (según se indica), en combinación con los plásmidos que expresan Bcl-X_L, GFP y reRFP. Se añadió dantrolina (50µM) 1 hora después de la transfección, y a las 36 h se analizaron las células *in vivo* mediante microscopía confocal.

Estos resultados indican que los iniciadores apoptóticos Bim_{EL} y tBid pueden causar en nuestro sistema cambios reticulares que permanecen indetectables con las técnicas usadas, excepto si se amplifican mediante la inhibición de los canales RyR. Además, el efecto coestimulador de Bcl-X_L en la dilatación reticular inducida por Bim_{EL} o tBid probablemente tenga su base en un efecto sobre Bak endógeno que, en coherencia con este modelo, se expresa en las células HEK-293T usadas (Figura 26).

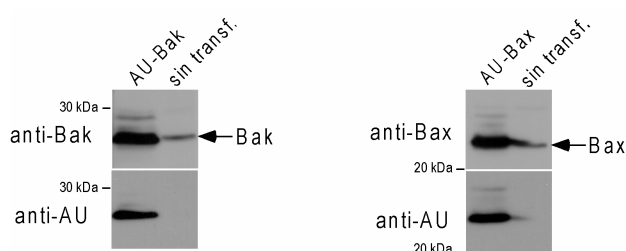


Figura 26. HEK-293T expresan Bak y Bax endógenos. Las células fueron transfectadas con los plásmidos indicados, o bien permanecieron sin transfectar hasta su lisis a las 24 h. Se muestran ensayos de *western blot* usando anticuerpos anti-bak o bax (parte superior). Las membranas fueron lavadas y posteriormente incubadas con un anticuerpo anti-AU (parte inferior).

1.8. PAPEL DE BAK ENDÓGENO EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL

1.8.1. Bim_{EL} y tBid inducen la dilatación del RE en células MEF-bax^{-/-}, pero no en células MEF-bak^{-/-}

Al objeto de explorar la posible implicación de Bak endógeno en la señal inducida por Bim_{EL} y tBid, se usaron células MEF deficientes en Bak, Bax o ambas proteínas. En MEF-*wt*, la cotransfección con Bim_{EL} o tBid en combinación con Bcl-X_L indujo vacuolización citoplasmática en presencia de dantrolina (Figura 27), un fenotipo que recapitula el efecto en células HEK-293T (Figura 24). Asimismo, el fenotipo de vacuolización no cambió sustancialmente en células carentes de Bax (MEF-bax^{-/-}, Figura 27), mientras las células MEF-bak^{-/-}, o dobles deficientes presentaban una ausencia casi completa del fenómeno (Figura 27).

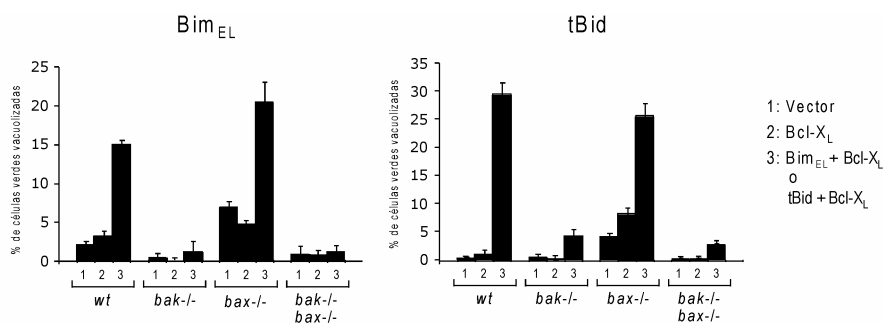


Figura 27. MEF deficientes en Bak son incapaces de generar la dilatación del RE en respuesta a Bim_{EL} o tBid, en presencia de Bcl-X_L y dantrolina. Los MEF indicados fueron transfectados con una mezcla de los plásmidos que se muestran, junto con GFP. La eficiencia de transfección fue siempre del 20 - 30%. 1 h después de la transfección se añadió a todos los pocillos tanto dantrolina (50µM) como z-VAD-fmk (100 µM), este último con objeto de reducir la muerte basal. A las 48 h se determinó el porcentaje de células vacuolizadas tal y como se describe en la Figura 11B. Se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos diferentes.

En su conjunto, estos resultados revelan la existencia de una vía de señalización implicada en la regulación de la conformación reticular en la que están implicadas proteínas BH3-*only* y Bak. Los datos mostrados apuntan a un modelo donde las señales de remodelación del RE inducidas por Bim_{EL} y tBid son enteramente transmitidas a través de Bak endógeno, mientras que Bax en su mayor parte resulta irrelevante.

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior sugieren que Bak puede tener un papel particularmente relevante en el RE, que podría tener implicaciones en la transducción de señales apoptóticas. Con objeto de estudiar esta posible función de Bak reticular en ausencia tanto del homólogo Bax como de la subpoblación mitocondrial de Bak, decidimos generar un sistema celular modelo que expresara exclusivamente Bak en las cisternas del RE. La generación de esta estirpe celular se ve facilitada por el hecho de que Bak, en condiciones fisiológicas, está insertada constitutivamente en membranas subcelulares, por lo que se puede dirigir con señales de localización adecuadas al orgánulo deseado.

2.1. GENERACIÓN DE UN SISTEMA MODELO APROPIADO PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR

2.1.1. Construcción de una versión completa de Bak con localización subcelular restringida al RE

Al objeto de generar una línea celular capaz de expresar Bak únicamente en el RE, se diseñó en primer lugar una versión de Bak que, una vez expresada ectópicamente en células, fuera dirigida exclusivamente a este orgánulo. Para ello, se utilizó una estrategia similar a la utilizada en la sección 1.5.2 para construir una versión reticular de Bak Δ BH3, pero usando en este caso Bak completo. Esta estrategia se basa en reemplazar el dominio transmembrana de Bak (C-terminal) por la secuencia de localización reticular cb5 (ver Materiales y Métodos). Para reconocer la proteína Bakcb5 se introdujo el epítipo AU en la zona N-terminal (ver Materiales y Métodos). Ensayos de IF mostraron una localización subcelular de Bakcb5 estrictamente limitada al RE, incluso cuando la proteína era sobreexpresada en transfecciones transitorias en diferentes líneas celulares (células HEK-293T y en las células parentales para la generación de la línea celular nueva, MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-}). Así, las versiones etiquetadas de Bakcb5 colocalizaron totalmente con los marcadores reticulares reGFP (ver Materiales y Métodos) o calnexina endógena, mientras que no se pudo apreciar expresión de la proteína de fusión en mitocondrias, visualizadas a su vez con los marcadores fluorescentes mGFP o mRFP (ver Materiales y Métodos) (Figura 28).

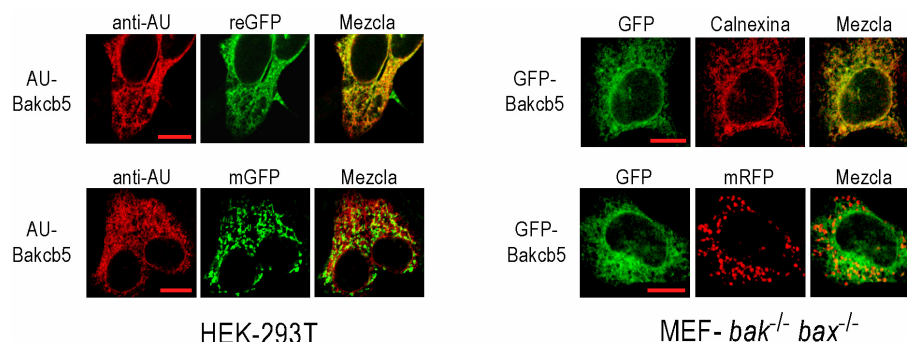


Figura 28. Expresión específica de Bakcb5 transfectado en el RE de células HEK-293T y MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-}. Células HEK-293T (panel izquierdo) fueron cotransfectadas con AU-Bakcb5 y reGFP o mGFP. 24 h más tarde se tiñeron para IF utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AU. Las células MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-} (panel derecho) fueron transfectadas con GFP-Bakcb5 en presencia o ausencia de mRFP, y a las 24 h se tiñeron con un anticuerpo frente a la calnexina (arriba), o se montaron directamente (abajo). Las imágenes de microscopía confocal muestran la colocalización de Bakcb5 con los marcadores reticulares (reGFP, izquierda; calnexina, derecha) pero no con las señales mitocondriales (mGFP, izquierda; mRFP, derecha).

2.1.2. Generación de una línea celular murina estable que expresa exclusivamente Bak reticular (MEF-DKO-AU1-Bakcb5).

Una vez comprobado por IF la localización de Bakcb5 restringida al RE, se partió de células MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-} para generar una población celular policlonal que expresara Bakcb5 de un modo

seleccionable. Con este fin se transdujeron las células MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-} parentales con un virus recombinante que codificaba una versión etiquetada de Bakcb5 (AU-Bakcb5) seleccionable con puromicina (ver Materiales y Métodos). Asimismo, se transdujeron las células parentales con un virus control que codificaba únicamente el gen de resistencia al antibiótico. Posteriormente se seleccionaron las células infectadas en medio adecuado (ver Materiales y Métodos).

2.1.3. Validación del modelo de células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 mediante estudios de inducción de muerte celular por proteínas BH3-only

Para analizar si la población policlonal MEF-Bakcb5 era susceptible a muerte celular en respuesta a estímulos apoptóticos, se infectaron las células con retrovirus capaces de expresar varias proteínas BH3-only. Para el estudio se escogieron los miembros Bim, tBid y Puma. Como ya se ha mencionado en la Introducción, estas proteínas son consideradas las moléculas BH3-only más potentes en la inducción de muerte celular. En ensayos de incorporación con yoduro de propidio se pudo constatar que la expresión de Bim_{EL} y Puma, pero no la de tBid, indujo un nivel detectable de muerte celular, mientras que tanto la población control como las células MEF-DKO parentales no transducidas permanecieron insensibles (Figura 29A). Ensayos de *western blot* con un anticuerpo anti-HA mostraron que las versiones BH3-only etiquetadas con HA se expresaban en niveles comparables (Figura 29B).

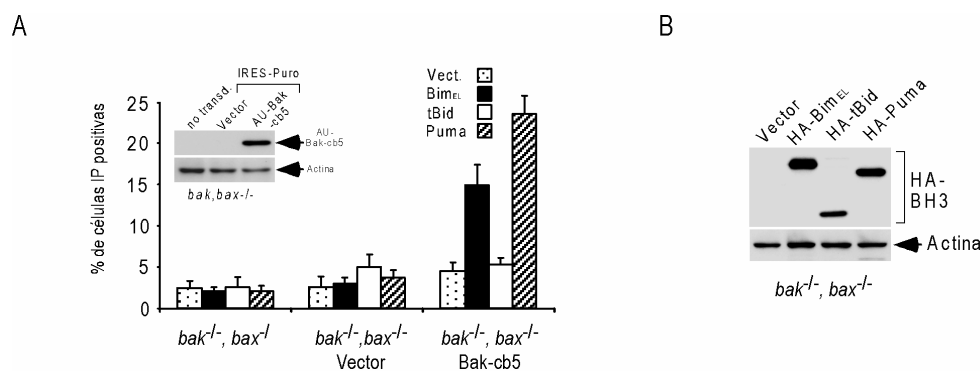


Figura 29. (A) La población policlonal que expresa la proteína AU-Bakcb5 de forma estable es susceptible a la apoptosis inducida por Bim_{EL} y Puma, pero no tBid. Las células fueron transducidas mediante retrovirus que expresan las moléculas BH3-only indicadas, y a las 24h se analizaron para muerte celular mediante tinción con IP. El panel insertado muestra la expresión específica de AU-Bakcb5 en las poblaciones ensayadas. **(B)** Niveles de expresión de HA-Bim_{EL}, HA-tBid y HA-Puma en células MEF-Bak^{-/-}Bax^{-/-}. Las células MEF fueron transducidas retroviralmente con versiones etiquetadas con HA de Bim_{EL}, tBid y Puma, y a las 24 h se lisaron para su análisis por *western blot* con un anticuerpo monoclonal frente al epítipo HA. Se utilizaron células MEF-DKO puesto que son resistentes a apoptosis y evitan, por tanto, una posible interferencia de la muerte celular inducida en los niveles de expresión de las diferentes proteínas.

El resultado de que la población policlonal generada fuera capaz de sufrir muerte celular inducida por Bim_{EL} y Puma indica que Bak reticular es suficiente para transmitir señales apoptóticas iniciadas por ciertas proteínas BH3-only. Esto nos animó a estudiar este sistema más en detalle. Con el fin de obtener un fenotipo más claro y de prevenir que la población policlonal derivara durante el cultivo continuo, se

generaron clones celulares a partir de la población policlonal seleccionada inicialmente. De los clones obtenidos se escogieron dos para estudios posteriores (#2 y #6). Ambos clones expresaban la proteína AU-Bakcb5 en niveles comparables (Figura 30A).

2.1.4. Expresión específica de Bakcb5 en el RE

Con objeto de comprobar bioquímicamente si Bakcb5 se expresaba específicamente en las membranas reticulares de ambos clones, se efectuaron fraccionamientos subcelulares y se analizaron las fracciones obtenidas mediante *western blot* con anticuerpos específicos para VDAC (como marcador de mitocondrias), calnexina (como marcador de microsomas) y AU para detectar Bakcb5. Las metodologías de fraccionamiento utilizadas proporcionaron una clara segregación de membranas mitocondriales con respecto a las membranas ligeras (retículo) (Figuras 30B y 30C). Mientras que AU-Bakcb5 estaba excluido de la fracción mitocondrial en ambos clones, sí estaba presente en el sobrenadante que contenía membranas ligeras (Figura 30B). El fraccionamiento adicional del sobrenadante postmitocondrial indicó, además, que Bakcb5 precipita con la fracción microsomal, copurificando con el marcador reticular calnexina (Figura 30C). Por tanto, la proteína AU-Bakcb5 se expresa en nuestro sistema celular exclusivamente en membranas reticulares.

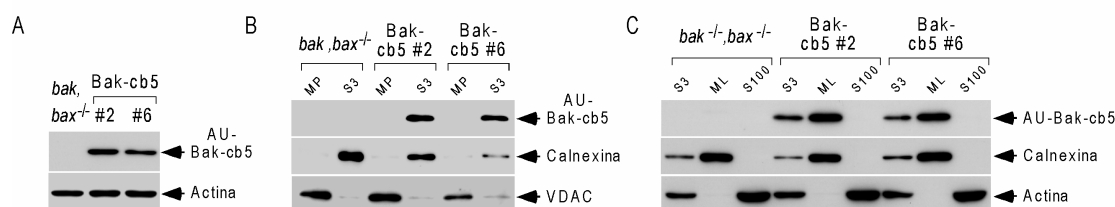


Figura 30. (A) Expresión de AU-Bakcb5 en los clones estables. Lisados totales de los clones MEF-Bakcb5#2 y #6 y de células parentales MEF-DKO fueron sometidos a *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AU. (B) AU-Bakcb5 no está presente en la fracción mitocondrial de los clones #2 y #6. Las células MEF-DKO parentales, MEF-Bakcb5#2 y #6, fueron lisadas, fraccionadas, y posteriormente cantidades iguales de proteínas fueron sometidas a *western blot* con los anticuerpos anti-AU, anti-calnexina y anti-VDAC. La imagen muestra una segregación completa del marcador mitocondrial (VDAC) y el marcador reticular (calnexina) en las fracciones de membranas pesadas (MP) y el sobrenadante postmitocondrial (S3). AU-Bakcb5 copurifica con el marcador reticular calnexina. (C) AU-Bakcb5 copurifica con calnexina en la fracción microsomal. Se fraccionaron lisados celulares de las mismas células que se describen en B, y posteriormente se sometieron cantidades iguales de proteína del sobrenadante postmitocondrial (S3), de la fracción de membranas ligeras (ML) y del sobrenadante de la fracción postmicrosomal (S100) a *western blot* con los anticuerpos anti-AU, anti-calnexina y anti-actina.

2.1.5. Determinación de la concentración de calcio del RE de los clones #2 y #6 de MEF-DKO-AU1-Bakcb5

Bak y Bax son necesarios para mantener los altos niveles de calcio que son característicos del lumen reticular, puesto que las células DKO presentan una concentración disminuida de calcio en el RE en

comparación con células silvestres (Scorrano, Oakes et al. 2003). Para analizar si la presencia de Bakcb5 en los clones escogidos (#2 y #6) es capaz de recuperar en alguna medida la concentración de calcio reticular, se llevaron a cabo mediciones de calcio con el indicador ratiométrico Fura-2 (ver Materiales y Métodos). En coherencia con los datos publicados, estos ensayos mostraron que ambos clones presentaban un nivel elevado de calcio reticular movilizado por TG en comparación con células MEF-DKO (Figura 31), lo que indica que Bakcb5 recupera los niveles de calcio en este orgánulo.

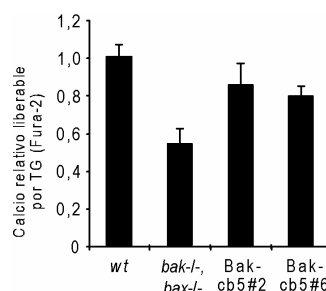


Figura 31. Las células MEF-Bakcb5#2 y #6 presentan niveles de calcio reticular recuperados con respecto a las células MEF-DKO parentales. Los datos están expresados como valores relativos de calcio liberado por TG en las células indicadas con respecto al valor obtenido para células MEF-wt.

Por tanto, hemos generado un sistema celular que presenta una expresión exclusivamente reticular de Bak con consecuencias funcionales en la recuperación de los niveles de calcio en el RE cercanas a la normalidad. Estos resultados, en su conjunto, nos llevaron a pensar que habíamos obtenido un modelo adecuado para estudiar el papel de Bak reticular en procesos de muerte celular.

2.2. APOPTOSIS MEDIADA POR BAK RETICULAR

Con el fin de explorar si la presencia exclusiva de Bak en el RE es suficiente para modular apoptosis, se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión de varias proteínas BH3-only.

2.2.1. Las proteínas BH3-only Bim_{EL} y Puma, pero no tBid, son capaces de estimular la muerte celular a través de Bak reticular

Mediante expresiones retrovirales de las proteínas Bim_{EL}, tBid y Puma se pudieron confirmar de un modo más sólido los resultados preliminares obtenidos con la población policlonal (Figura 32). La expresión de Bim_{EL} y Puma indujo muerte celular en células MEF-Bakcb5 en una proporción comparable a la sufrida por células MEF-Bax^{-/-}. Por el contrario, la expresión de tBid fue incapaz de inducir muerte celular en células MEF-Bakcb5, aunque sí indujo muerte eficiente en células wt y Bax^{-/-} (Figura 32). Este último resultado corrobora la ausencia de niveles funcionales de Bak en la mitocondria en los clones que

expresan Bakcb5. Dado que se sabe que la presencia de efectores proapoptóticos multidominio en la mitocondria es suficiente para la inducción de apoptosis mitocondrial inducida por tBid (Scorrano, Oakes et al. 2003).

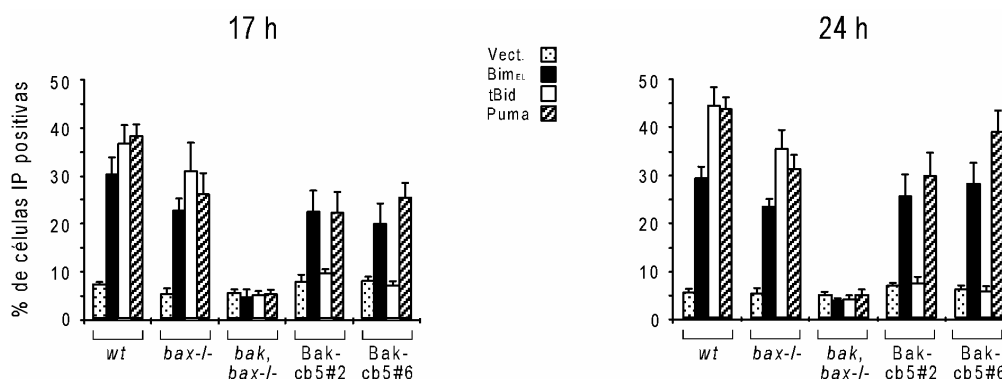


Figura 32. La expresión de Bim_{EL} y Puma en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 induce muerte celular. Las células indicadas fueron transducidas mediante retrovirus que expresan las moléculas Bim_{EL}, tBid y Puma. Posteriormente se evaluó la muerte celular a las 17 y 24 horas tras la infección mediante tinción con IP.

2.2.2. La muerte celular inducida por Bim_{EL} y Puma en los clones que expresan Bakcb5 es apoptosis y dependiente de la mitocondria

Marcaje con Anexina V-IP

Para determinar si el tipo de muerte celular inducido por Bim_{EL} y Puma en los clones que expresan Bakcb5 era apoptosis, se tiñeron células transducidas con estas dos moléculas con IP y el marcador de apoptosis Anexina V. Ensayos de citometría de flujo mostraron que la expresión de Bim_{EL} y Puma inducía un porcentaje similar de células positivas para Anexina V y negativas para IP en los clones que expresan Bakcb5 y en MEF-wt o MEF-Bax^{-/-} (Figura 33).

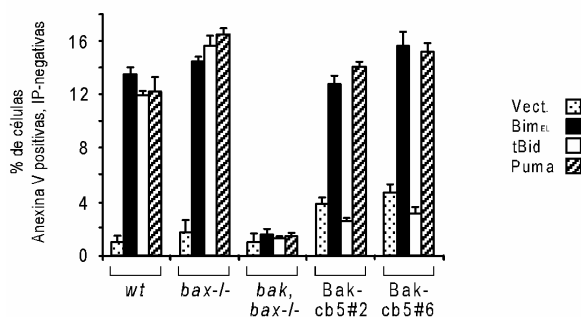


Figura 33. La transducción retroviral de MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 con Bim_{EL} y Puma causa un aumento en la unión de Anexina V. Las células se transdujeron como se describe en la Figura 32, y 24 h más tarde se analizó su reactividad a Anexina V mediante citometría de flujo.

Activación de las procaspasas 9 y 3 y movilización de citocromo c

Tal y como se describe en la Introducción, la implicación de la vía apoptótica mitocondrial clásica está mediada por la liberación de citocromo c del espacio intermembranal de las mitocondrias y la subsiguiente formación del complejo del apoptosoma que promueve el procesamiento de la caspasa 9 a las subunidades catalíticas p37 y p39, las cuales a su vez desencadenan la activación de caspasas ejecutoras (las caspasas 3,6 y 7).

Con el fin de determinar la implicación de esta vía en el sistema estudiado, se analizaron lisados celulares totales mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos para las caspasas activadas 3 y 9. Los resultados indicaron niveles comparables de procesamiento proteolítico de ambas procaspasas entre los clones MEF-DKO-AU1-Bakcb5 y MEF-*wt* o MEF-Bax^{-/-} en respuesta a la expresión de Bim_{EL} o Puma (Figura 34). Asimismo, ensayos de IF utilizando un anticuerpo frente a citocromo c indicaron que entre un 25 y 40% de células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 transducidas con las moléculas BH3-only presentaban una distribución citoplasmática de citocromo c, una porción sólo ligeramente menor que en células MEF-*wt* o MEF-Bax^{-/-} (Figura 34B).

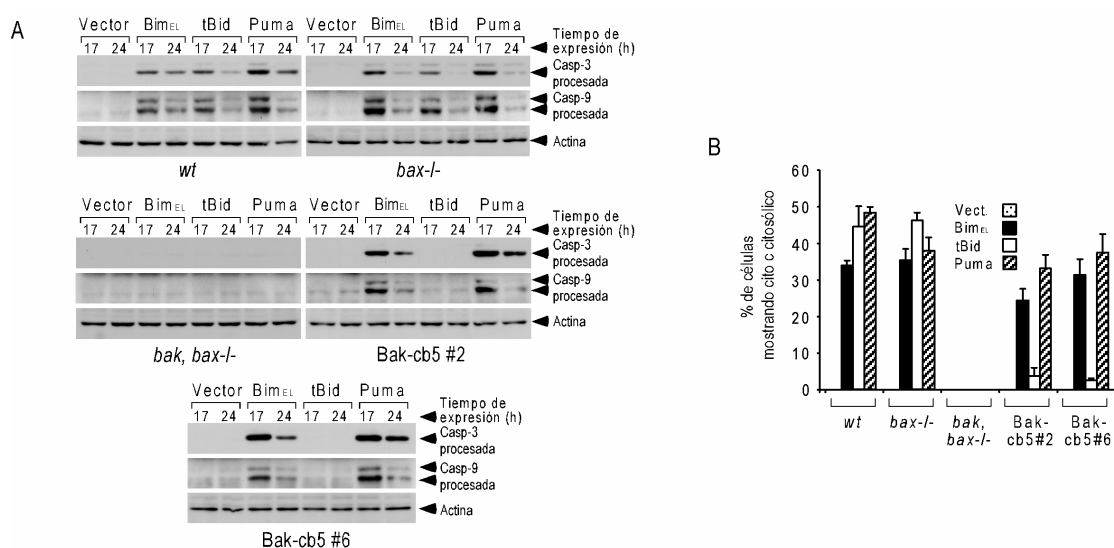


Figura 34. (A) Activación de las procaspasas 3 y 9 mediante Bim_{EL} y Puma en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6. Las células fueron transducidas, lisadas a los tiempos indicados y cantidades iguales de proteína analizadas por *western blot* con los anticuerpos que detectan las subunidades catalíticas p37 y p39 de la caspasa 9, o p17 y p19 de la caspasa 3. **(B)** Bim_{EL} y Puma provocan la salida de citocromo c en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6. Las células indicadas fueron transducidas en presencia de 100µM z-VAD-fmk y 17 h más tarde, se tiñeron para IF con un anticuerpo frente a citocromo c. A continuación se evaluó el porcentaje de células que mostraban una distribución difusa del marcador. Se cuantificaron un total de al menos 600 células por cada condición experimental. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los valores obtenidos en al menos 8 campos diferentes.

Se ha descrito que la caspasa 12 de células murinas está localizada en membranas reticulares y puede mediar la respuesta apoptótica iniciada por estrés en el RE y Bim (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Morishima, Nakanishi et al. 2004), activando directamente la procaspasa 9 sin la implicación de la mitocondria (Morishima, Nakanishi et al. 2002). En nuestro sistema, sin embargo, no se detectó la

activación de caspasa 12 en respuesta a Bim_{EL} o Puma en ninguno de los dos clones, aunque agentes inductores de estrés reticular, como BFA (Nakagawa, Zhu et al. 2000), sí eran capaces de procesar la caspasa a la subunidad catalítica p42 en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5. Además, los ensayos de movilización de citocromo c se llevaron a cabo en presencia del bloqueador de caspasas de rango amplio, z-VAD-fmk, cuya capacidad inhibitoria incluye también a la caspasa 12. Ambos resultados argumentan en contra de un papel de esta caspasa en la señalización apoptótica inducida por Bim_{EL} y Puma en células MEF-Bakcb5 (Figura 35).

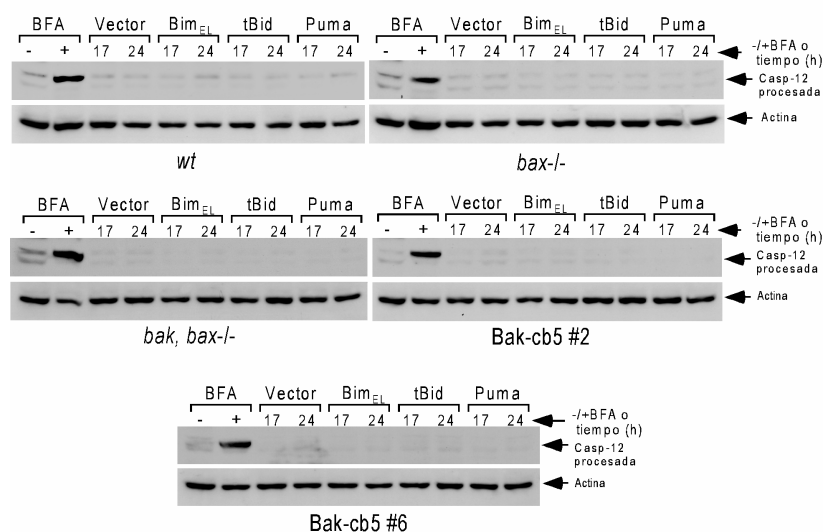


Figura 35. Ausencia de activación de caspasa 12 en respuesta a Bim_{EL} o Puma en clones los que expresan Bak reticular. Las células fueron transducidas y, 17 ó 24 h después, lisadas para la detección del procesamiento de caspasa 12 por western blot con un anticuerpo específico. Se usó brefeldina a 10 μ g/ml durante 24 h como control positivo.

Susceptibilidad de la muerte celular a inhibidores de caspasas

Con objeto de explorar la implicación de las caspasas en el proceso apoptótico mediado por Bak reticular, se usaron inhibidores comerciales de la maquinaria de caspasas, bien de amplio rango (z-VAD-fmk), o bien específico de la caspasa 9 (z-LEHD-fmk). z-VAD-fmk reveló la implicación de la maquinaria general de las caspasas puesto que, en ensayos de incorporación con IP, este inhibidor bloqueó casi completamente la muerte celular provocada por Bim_{EL} y Puma en los clones de una forma parecida a la inhibición ocurrida en células MEF-*wt* o MEF-Bax^{-/-} (Figura 36A). De modo similar, el tratamiento con el inhibidor comercial de la caspasa 9 (z-LEHD-fmk, Figura 36B) redujo el porcentaje de células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 que se mueren en respuesta a Bim_{EL} y Puma, lo que refuerza la idea anterior de la implicación de esta caspasa en la vía señalizadora.

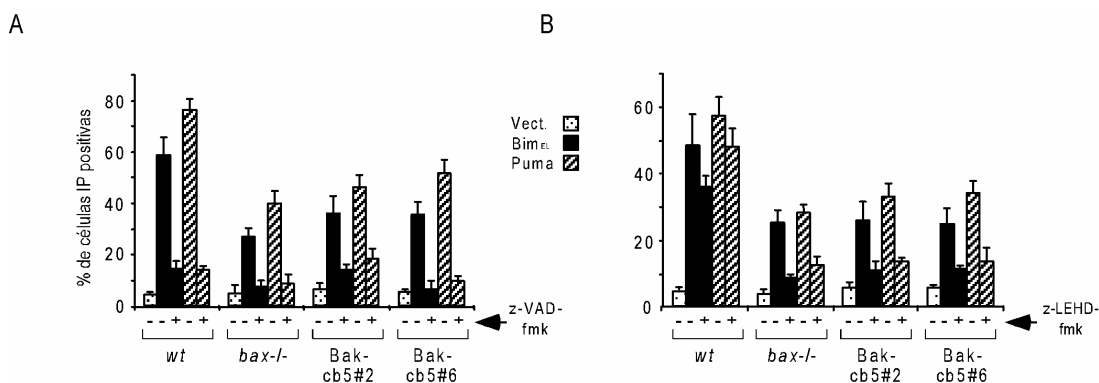


Figura 36. (A) La muerte celular causada por Bim_{EL} y Puma en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 es inhibida por el inhibidor de caspasas de rango amplio z-VAD-fmk. Se transdujeron las células indicadas en presencia o ausencia de 80µM z-VAD-fmk, y 24 h más tarde se analizó el porcentaje de células muertas mediante la incorporación de IP. **(B)** Inhibición de muerte celular mediante el inhibidor comercial específico de caspasa 9, z-LEHD-fmk. Las células fueron tratadas como en (A), salvo en que se usó el inhibidor z-LEHD-fmk (80µM). A las 17 h se evaluó la aparición de muerte celular como se describe en (A).

Los resultados obtenidos en este apartado apuntan a una vía de señalización apoptótica inducida por las proteínas BH3-*only* Bim_{EL} y Puma a través de Bak reticular. Si además se considera el paralelismo de los datos de movilización de citocromo c al citosol con aquellos de activación o inhibición de la caspasa 9, la implicación de la mitocondria en esta vía de señalización es muy probable, a pesar de la ausencia de Bak y Bax en este orgánulo. Esta implicación mitocondrial sugiere la existencia de una vía de comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria capaz de inducir apoptosis mitocondrial de forma independiente de Bak y Bax mitocondriales.

2.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE BIM_{EL} Y PUMA Y LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVÉS DE BAK RETICULAR

Se sabe que en condiciones fisiológicas las proteínas Bim y Puma pueden actuar tanto en la mitocondria como en el RE (Yamaguchi y Wang 2002; Morishima, Nakanishi et al. 2004; Shibue, Suzuki et al. 2006). Para determinar la relevancia y contribución de cada uno de estos dos orgánulos a la vía apoptótica que estas dos moléculas BH3-*only* inducen en células MEF-Bakcb5 utilizamos versiones selectivamente dirigidas al RE y a la mitocondria.

Con el fin de expresar Bim_{EL} y Puma de forma restringida en el RE o en la mitocondria, generamos versiones de ambas moléculas fusionadas, bien a la secuencia de localización reticular cb5, o bien la señal ActA de localización en la membrana exterior de la mitocondria (Zhu, Cowie et al. 1996). Experimentos control con marcadores específicos de cada orgánulo mostraron una localización subcelular correcta de todas las moléculas químicas (Figura 37).

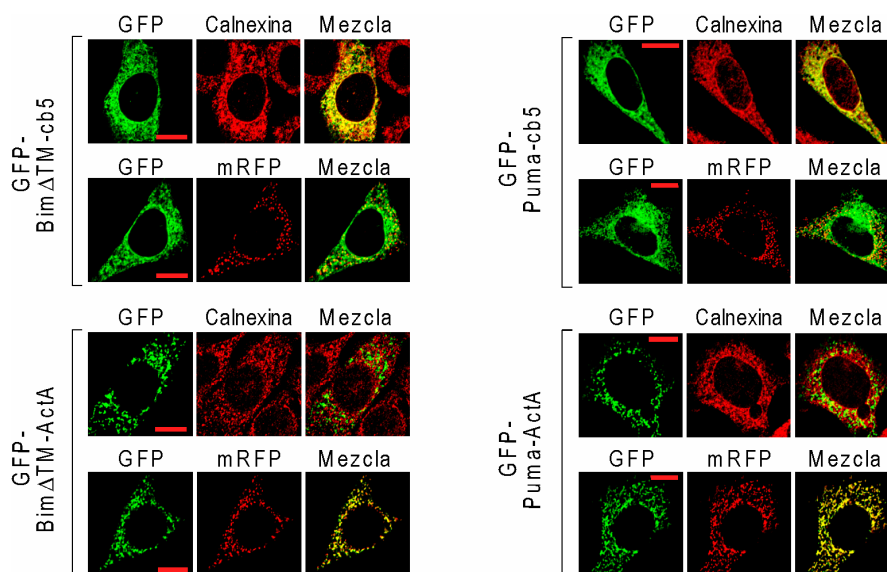


Figura 37. Expresión específica de los derivados cb5 y ActA de Bim_{EL} y Puma en el RE y la mitocondria, respectivamente. Las versiones etiquetadas con GFP de Bim_{EL}ΔTMcb5 y Pumacb5 o ActA que se indican fueron transfectadas en el clon 2. Se cotransfectaron las células con mRFP donde se indica. Se trataron todas las muestras con 100μM z-VAD-fmk, y a las 48 h de la transfección se tiñeron con un anticuerpo frente a la calnexina, o se montaron las muestras con mRFP directamente. Las imágenes muestran la colocalización de las proteínas quiméricas cb5 con el marcador reticular calnexina, mientras que las fusionadas a ActA presentan colocalización con el marcador mitocondrial mRFP.

Ensayos de sobreexpresión para evaluar la capacidad apoptótica de estas moléculas en los clones MEF-Bakcb5 revelaron que Bim_{EL}ΔTM-ActA presentaba una actividad disminuida en la liberación de citocromo c de la mitocondria y en la activación de las procaspasas 9 y 3 en comparación con la molécula Bim_{EL} silvestre (Figura 38A y 38B), a pesar de que las dos moléculas se expresan a niveles similares (Figura 38C). Por el contrario, Bim_{EL}ΔTM-cb5 retuvo totalmente ambas actividades (Figuras 38A y 38B) e indujo un proceso de muerte celular inhibible tanto por el inhibidor de caspasa 9 como por z-VAD-fmk (Figura 38D). Estos resultados indican que el efecto apoptótico de Bim_{EL} silvestre en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 es probablemente reticular en su mayor parte. Inesperadamente, sin embargo, Puma-ActA (mitocondrial) retuvo el potencial para inducir la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 de Puma silvestre (Figuras 38A y 38B). Esto sugiere que la expresión de Bak en el RE podría tener implicaciones más amplias en la red de señalización apoptótica de lo que se pensaba anteriormente, dado que de algún modo parece restaurar la susceptibilidad de mitocondrias deficientes en Bak y Bax a la apoptosis inducida por Puma exclusivamente mitocondrial. Pero de forma más interesante en el contexto de nuestro trabajo, Puma-cb5 fue capaz de provocar liberación de citocromo c (Figura 38B), activación de caspasas (Figuras 38A y 38B) y muerte dependiente de la caspasa 9 (Figura 38D) de forma comparable a la molécula silvestre. De esta manera, y a diferencia de Bim_{EL}, el efecto apoptótico de Puma en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 es probablemente una mezcla de sucesos iniciados tanto en membranas mitocondriales como en las reticulares. De todas maneras, en su conjunto estos datos apuntan a que la activación exclusiva de Bak reticular por los derivados cb5 de Bim_{EL} y Puma induce la transmisión de señales apoptóticas a la mitocondria para provocar la liberación de citocromo c e inducir

apoptosis. Obviamente, este modelo implica la existencia de un mecanismo de comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria que ejecute el programa apoptótico mitocondrial en ausencia de Bak y Bax.

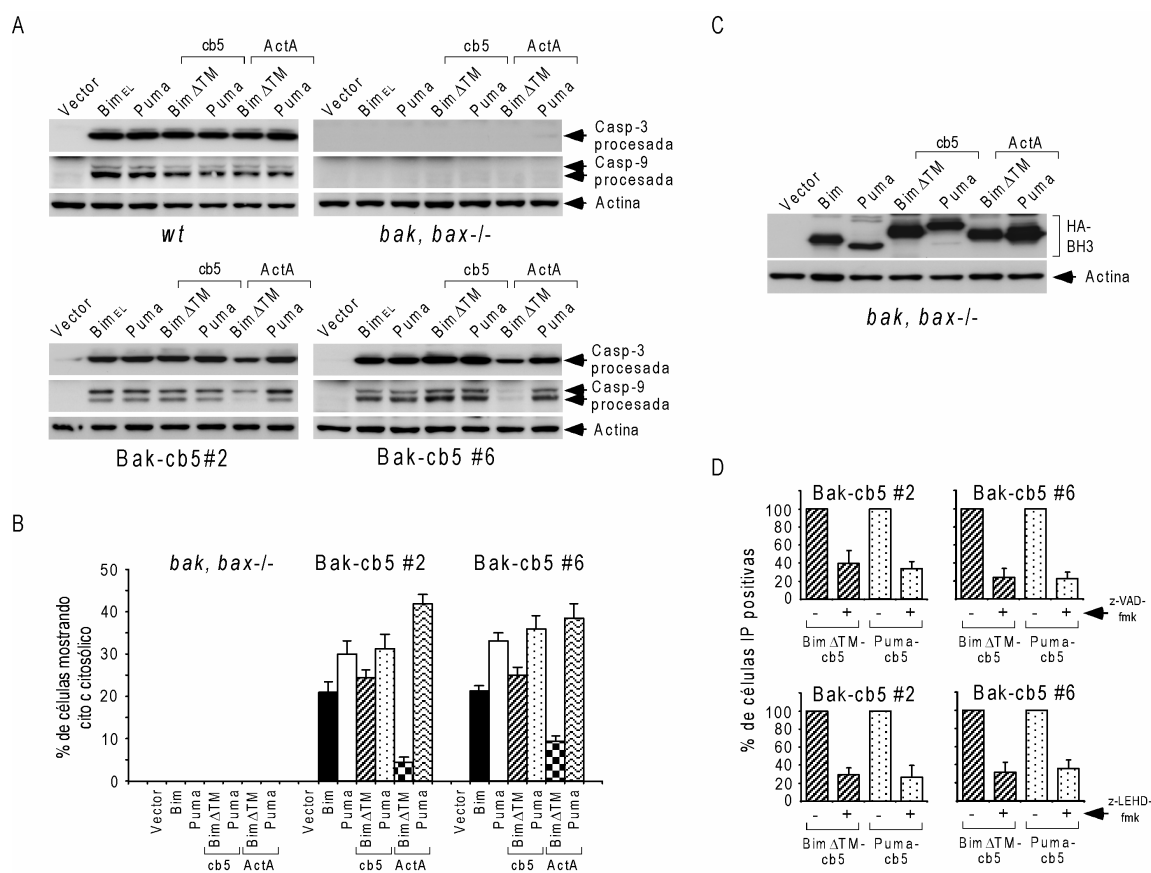


Figura 38. Bim_{EL} y Puma dirigidos selectivamente a membranas reticulares retienen la capacidad de estimular apoptosis mitocondrial en células MEF que expresan Bakcb5. (A) Activación de las procaspasas 9 y 3 en respuesta a las versiones cb5 y ActA de Bim_{EL} y Puma en los clones 2 y 6. Las células fueron transducidas como se indica. A las 17 h se lisaron y se analizó el grado de activación de las procaspasas mediante *western blot* con anticuerpos específicos para las caspasas correspondientes. (B) Salida de citocromo c provocada por la expresión de las quimeras cb5 o ActA de Bim_{EL} y Puma. Se transdujeron las células indicadas en presencia de z-VAD-fmk, y a las 17 h se tiñeron para citocromo c. Tanto las cuantificaciones como las estadísticas se llevaron a cabo como se describe en la Figura 35. (C) Expresión de versiones cb5 y ActA de Bim_{EL} y Puma en células MEF-DKO. A las 24 h de la transducción con formas etiquetadas de Bim_{EL} o Puma las células fueron lisadas para el análisis por *western blot* con un anticuerpo anti-HA. (D) Los derivados cb5 de Bim_{EL} y Puma inducen un proceso apoptótico sensible a los inhibidores z-VAD-fmk y z-LEHD-fmk. Se infectaron ambos clones retroviralmente con las moléculas indicadas, y en presencia o ausencia de 80µM de z-VAD-fmk o z-LEHD-fmk. A las 24 h (z-VAD-fmk) ó 17 h (z-LEHD-fmk) más tarde se analizó el porcentaje de células muertas mediante incorporación de IP. Se presentan valores relativos con respecto al valor obtenido en ausencia de los inhibidores.

2.4. ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN APOPTÓTICA ENTRE EL RE Y LA MITOCONDRIA EN LOS CLONES QUE EXPRESAN BAKCB5

2.4.1. Función del calcio reticular

Aunque no se ha podido esbozar un esquema consenso sobre la transmisión de señales apoptóticas entre el RE y la mitocondria, existe en la bibliografía una serie de evidencias que apoyan la

implicación de tránsitos de calcio en este fenómeno (Rizzuto, Pinton et al. 2003; Walter y Hajnoczky 2005; Pizzo y Pozzan 2007). Además, la función de Bak y Bax en el RE se ha relacionado con la regulación de los niveles y la movilización de calcio de este orgánulo (Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003). Por un lado, se ha visto que la expresión forzada de Bak y Bax da lugar a la salida de calcio del RE (Nutt, Pataer et al. 2002; Zong, Li et al. 2003). Por otro lado, células MEF carentes de Bak y de Bax presentan niveles de calcio disminuidos en el lumen del RE, dando lugar a una respuesta apoptótica menor inducida por estímulos que utilizan calcio reticular para activar el programa apoptótico (Scorrano, Oakes et al. 2003). Asimismo, se ha descrito que Puma presenta capacidad de provocar apoptosis a través de la movilización de calcio del RE (Shibue, Suzuki et al. 2006).

Al objeto de evaluar si una descarga de calcio del RE es suficiente para activar apoptosis mitocondrial en nuestro sistema, se analizó la inducción de diversos parámetros relacionados con muerte celular en los clones MEF-Bakcb5, en respuesta a conocidos agonistas del calcio reticular. El tratamiento con TG indujo un porcentaje más alto de muerte celular en comparación con el efecto de la droga en células MEF-DKO parentales (Figura 39A). Este resultado confirma observaciones previas del grupo del Dr. Korsmeyer, en las que se comprobó que el restablecimiento entero de la concentración de calcio reticular en células MEF-DKO a través de la sobreexpresión de la bomba SERCA, un suministrador que garantiza niveles altos de calcio reticular, mejora la respuesta apoptótica con estímulos que inducen muerte celular a través del calcio del RE (Scorrano, Oakes et al. 2003). Sin embargo, y de forma sorprendente, esta inducción moderada de muerte celular en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 no fue acompañada de una movilización detectable de citocromo c al citoplasma ni de la activación de las procaspasas 9 y 3 (Figuras 39B y 39C), descartándose, por tanto, la implicación de la maquinaria apoptótica mitocondrial en la muerte inducida por TG.

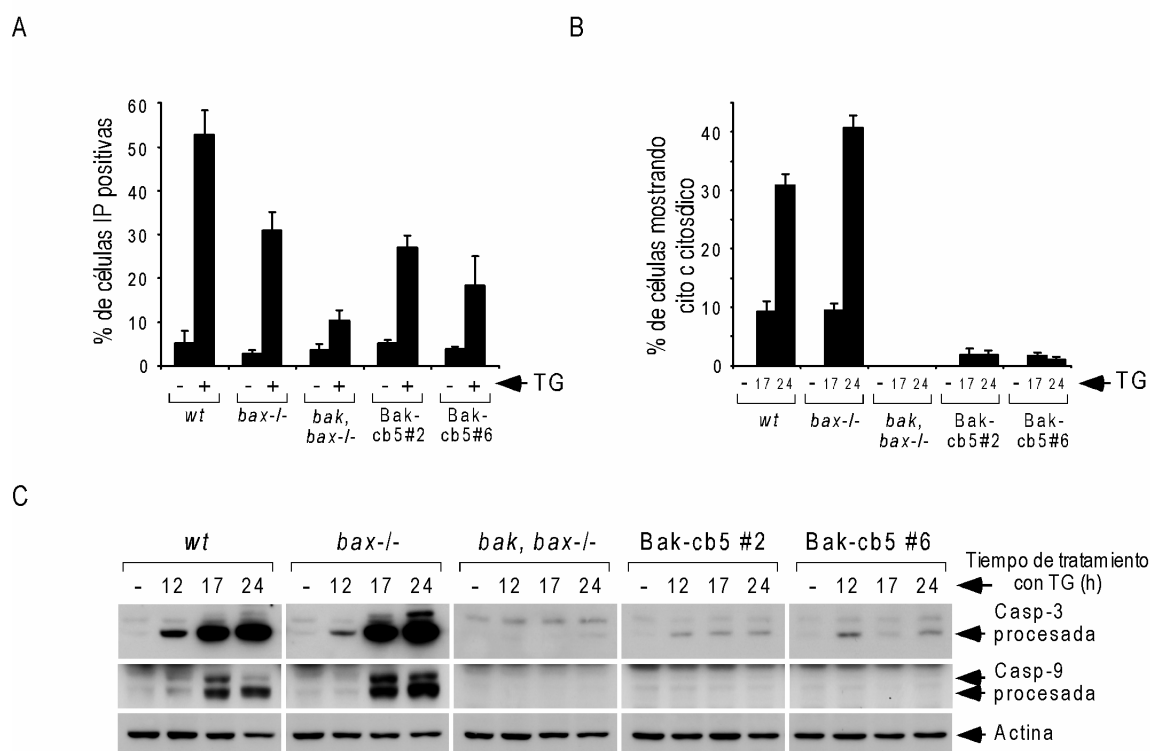


Figura 39. Agonistas del calcio reticular son incapaces de estimular la apoptosis mitocondrial en clones que expresan Bakcb5. (A) Tapsigargin induce muerte celular en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6. Se trataron las células indicadas con TG (5µM) durante 24h. Posteriormente se midió el porcentaje de células positivas para IP mediante citometría de flujo. **(B)** La muerte inducida por TG no está acompañada de la liberación de citocromo c de la mitocondria. Se trataron las células indicadas como en (A) en presencia de 100 µM z-VAD-fmk. A los tiempos que se indican, las células fueron teñidas con un anticuerpo frente a citocromo c y cuantificadas como se describe en la Figura 35. **(C)** Ausencia de la activación de las procaspasas 3 y 9 en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 tratadas con TG. Las células fueron tratadas con 5µM de TG durante los tiempos indicados, y posteriormente procesadas para la detección de las subunidades activas correspondientes a las procaspasas 9 y 3 mediante análisis de *western blot*.

En concordancia con estos resultados obtenidos con TG, otros estímulos, como C₂-ceramida o agentes que inducen estrés oxidativo (H₂O₂), conocidos por utilizar la vía de calcio reticular para la inducción de apoptosis (Pinton, Ferrari et al. 2001; Scorrano, Oakes et al. 2003), tampoco fueron capaces de activar las caspasas 9 y 3 en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 (Figura 40).

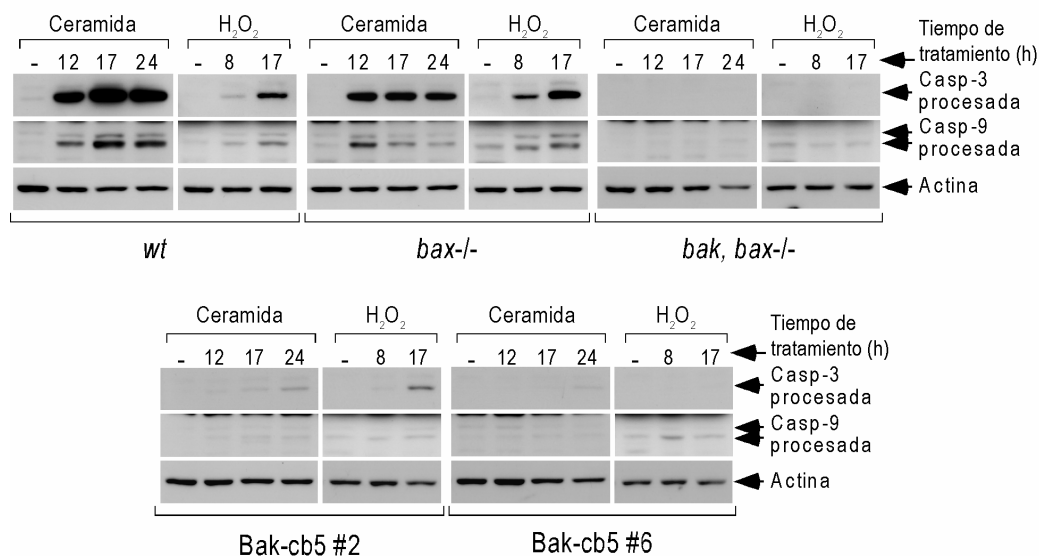


Figura 40. Los agentes inductores de calcio reticular C₂-ceramida y H₂O₂ son incapaces de activar el procesamiento proteolítico de las procaspasas 3 y 9 en los clones que expresan Bakcb5. Las células fueron tratadas con 100µM C₂-ceramida ó 1mM H₂O₂ durante los tiempos indicados, y posteriormente procesadas como se describe en la Figura 39C.

Estos resultados indican que los flujos de calcio liberado del lumen del RE son incapaces de inducir movilización de citocromo c y apoptosis mitocondrial en ausencia de Bak y Bax expresados en las membranas de la mitocondria. Como consecuencia de estos resultados parece poco probable que la liberación de calcio reticular sea el único mediador (si es que juega algún papel) de la apoptosis inducida por Bim_{EL} y Puma reticulares (fusiones cb5) en los clones que expresan Bakcb5.

A fin de explorar un papel necesario del calcio en este sistema, se llevaron a cabo experimentos de expresión de las versiones reticulares Bim_{EL} y Puma en presencia de inhibidores de calcio, como 2-APB (un inhibidor relativamente inespecifico de los canales IP₃R del RE y de los canales de calcio SOCC presentes en la membrana plasmática (Bootman, Collins et al. 2002; Peppiatt, Collins et al. 2003)) o el quelante de calcio intracelular Bapta-AM. La presencia de estos compuestos inhibió de forma sustancial tanto la activación de las caspasas 9 y 3 (Figura 41A) como la movilización de citocromo c al citoplasma inducidas por Bim_{EL}ΔTMcb5 y Pumacb5 en los clones MEF-DKO-AU1-Bakcb5 (Figura 41B).

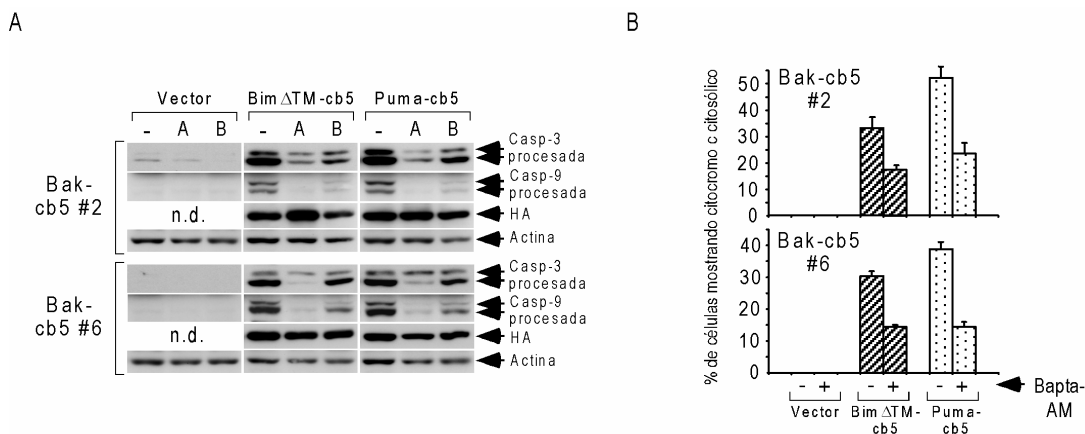


Figura 41. La comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 es en parte mediada por calcio. (A) Los inhibidores de calcio 2-APB o Bapta-AM reducen el nivel de activación de las procaspasas 9 y 3 provocada por la expresión de Bim Δ TMcb5 y Pumacb5. Los clones que expresan Bakcb5 fueron transducidos retroviralmente con Bim Δ TMcb5 o Pumacb5. A las 8 h tras la infección se trataron las células con 2-APB (75 μ M) o Bapta-AM (15 μ M). 17 horas tras la transducción, se lisaron y se sometieron a *western blot* utilizando anticuerpos específicos para las caspasas procesadas 9 y 3. (B) El tratamiento con Bapta-AM inhibe la liberación de citocromo c de la mitocondria. Las células fueron transducidas y tratadas como se indica en (A) con la salvedad de que se usó 100 μ M z-VAD-fmk para minimizar la muerte celular. A las 17 h de la infección las células se tiñeron mediante IF con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo c. Las cuantificaciones se realizaron como se describe en la Figura 38B.

Estos resultados indican que una movilización de calcio reticular probablemente esté involucrada en la comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria en este sistema, aunque parece insuficiente para activar esta vía de señalización. Como consecuencia de esto, deben existir mecanismos adicionales involucrados en el diálogo apoptótico cruzado entre estos dos orgánulos en los clones que expresan Bakcb5.

2.4.2. Papel de proteínas implicadas en la respuesta celular a estrés reticular en la transmisión de señales apoptóticas a través de Bak reticular

Bak reticular participa en la respuesta celular desencadenada por situaciones de estrés en el RE a través de una unión directa al sensor de estrés IRE1 α , una interacción que parece favorecer la activación de esta última molécula (Hetz, Bernasconi et al. 2006). IRE1 α , a su vez, procesa por *splicing* alternativo el factor de transcripción XBP-1, generando el fragmento activo sXBP-1. Este fragmento promueve finalmente la transcripción de proteínas encargadas de aliviar la situación de estrés reticular y restablecer el funcionamiento correcto del orgánulo (Wu y Kaufman 2006; Ron y Walter 2007). Adicionalmente, y aparte de activar XBP-1, IRE1 α estimulado es capaz de reclutar la proteína adaptadora TRAF2 que a su vez promueve la activación secuencial de las quinasas ASK1 y JNK (Ron y Walter 2007). Aunque recientemente se ha postulado que la función principal de IRE1 α es favorecer la supervivencia celular (Lin, Li et al. 2007), también se sabe que la vía de señalización IRE1 α /TRAF2/ASK1 puede inducir

apoptosis en situaciones en las que el daño causado por estrés en el RE es irreparable para la célula (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002; Szegezdi, Logue et al. 2006; Ron y Walter 2007).

Con objeto de evaluar si esta maquinaria de señalización está involucrada en la apoptosis inducida por Bim_{EL}ΔTMcb5 y Pumacb5 en los clones que expresan Bakcb5, en primer lugar se exploró un posible efecto dominante negativo de una versión truncada de TRAF2 (TRAF2-DN, ver Materiales y Métodos), de la que se conoce su capacidad de interferir con esta ruta de estrés reticular (Urano, Wang et al. 2000). La expresión de TRAF2-DN produjo una reducción sustancial en la salida de citocromo c de las mitocondrias inducida por Bim_{EL}ΔTM-cb5 o Puma-cb5 en ambos clones (Figura 42A). Resultó interesante que el tratamiento adicional con Bapta-AM fuera capaz de inhibir casi por completo esta liberación de citocromo c (Figura 42A), una reducción cooperativa que tuvo un efecto paralelo tanto en la activación de las procaspasas 9 y 3 (Figura 42B) como en muerte celular (Figura 42C). Además, experimentos de *knock-down* de IRE1α con técnicas de ARNi mostraron una inhibición similar en la liberación de citocromo c por Bim_{EL} y Puma reticulares (Figura 42D), y la presencia simultánea de Bapta-AM también provocó una reducción más acusada (Figura 42D).

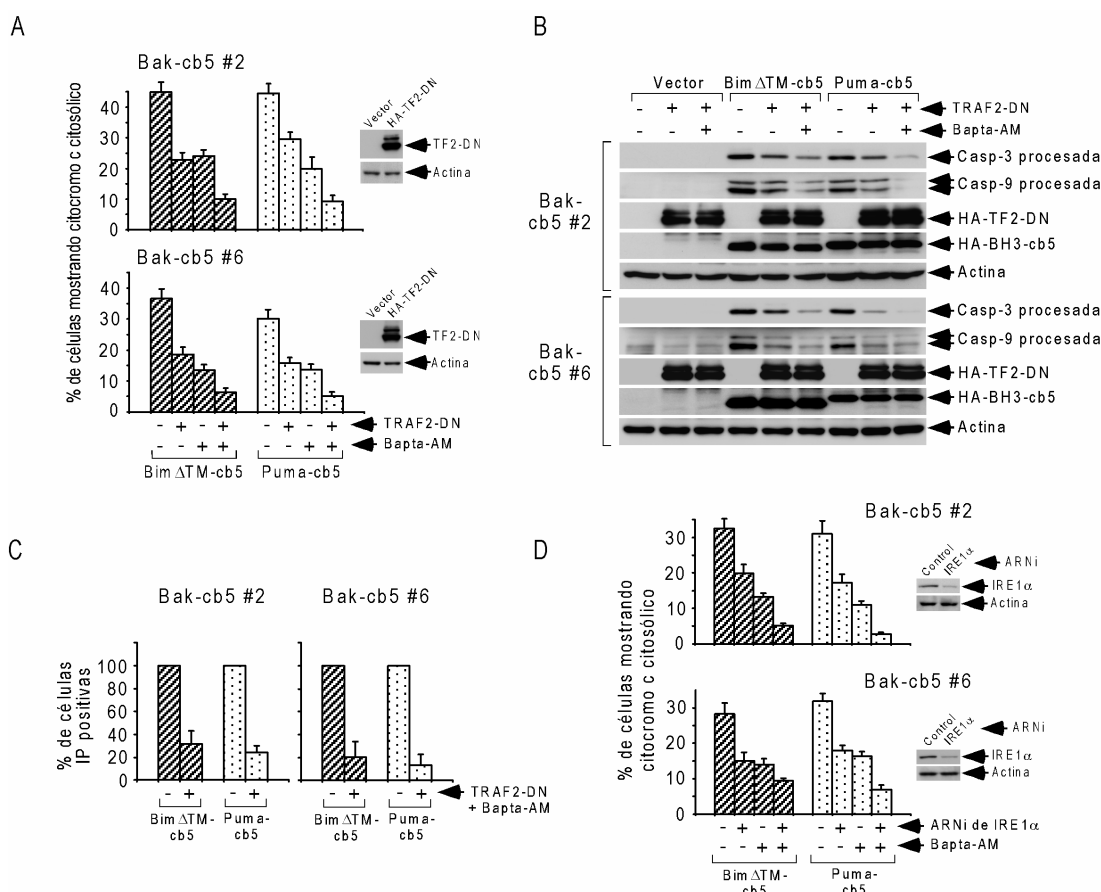


Figura 42. La comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria en células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 está mediada por calcio e IRE1/TRAF2. (A) Efecto de TRAF2-DN y Bapta-AM en la salida de citocromo c de la mitocondria. Las células fueron transducidas dos veces con un retrovirus que expresa TRAF2-DN, y 48 h más tarde transducidas de nuevo con Bim_{EL}ΔTMcb5 o Pumacb5, y tratadas con Bapta-AM (como en la Figura 41B). Los paneles insertados muestran la expresión de TRAF2-DN visualizada mediante *western blot* anti-HA. 17 h más tarde, las células se tiñeron mediante IF con un anticuerpo anti-citocromo c. **(B)** Efecto de TRAF2-DN y Bapta-AM en la activación de las caspasas 9 y 3. Las

células fueron transducidas y tratadas como en (A) con la salvedad de que no se trataron con z-VAD-fmk. 17 horas tras la infección con Bim_{EL}ΔTMcb5 o Pumacb5 las células fueron lisadas para *western blot* con los anticuerpos que se indican. (C) Efecto de la combinación de TRAF2-DN/Bapta-AM en muerte celular. Las células fueron transducidas y tratadas como en (B), y a las 24 horas de la transducción con Bim_{EL}ΔTMcb5 y Pumacb5 se tiñeron con IP para evaluar muerte celular. (D) Efecto de la depleción de IRE1α y Bapta-AM en la movilización de citocromo c. Las células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 fueron transfectadas con los ARNi indicados y, 48 más tarde, infectadas y tratadas como en (B). El panel insertado muestra la reducción de expresión de IRE1α inducida por el ARNi específico, evaluada por *western blot* anti-IRE1α

Estos resultados indican que IRE1α y TRAF2 median en la señalización apoptótica inducida por Bak reticular tras su activación por Bim_{EL} y Puma, actuando en coordinación con el calcio para inducir liberación de citocromo c y apoptosis mitocondrial en mitocondrias carentes de Bak y Bax. Estas observaciones revelan que el RE es capaz de operar como sitio autónomo de integración de señales apoptóticas transmitidas por moléculas BH3-*only* de un modo similar a la mitocondria. El hecho de que esta vía reticular sea independiente de Bak y Bax mitocondriales sugiere que probablemente funcione independientemente de los mecanismos que normalmente regulan estos efectores al nivel de la mitocondria, lo que añade un nivel de regulación adicional al proceso apoptótico.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis apuntan a dos funciones nuevas de la molécula Bak en membranas reticulares (Figura 43). 1.) Bak, activado por su homólogo antiapoptótico Bcl-X_L, presenta la capacidad de remodelar la estructura del RE, una función que puede ser inducida por moléculas BH3-*only* como Bim o tBid. 2.) Bak reticular es capaz de transmitir señales apoptóticas inducidas por los miembros Bim o Puma para promover la apoptosis mitocondrial a través de una vía que opera en ausencia de Bak y Bax presentes en este orgánulo. Esta vía de comunicación entre el RE y la mitocondria está mediada a través de la movilización de calcio y por los componentes de sistema de respuesta al estrés reticular IRE1α/TRAF2.

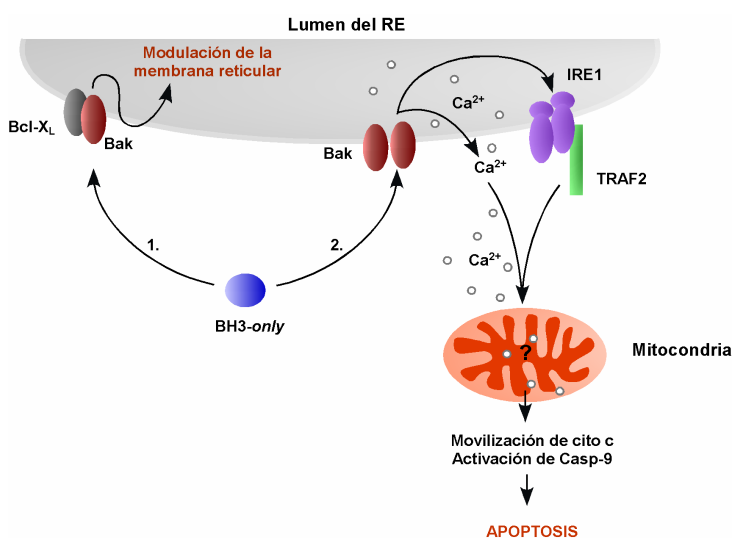
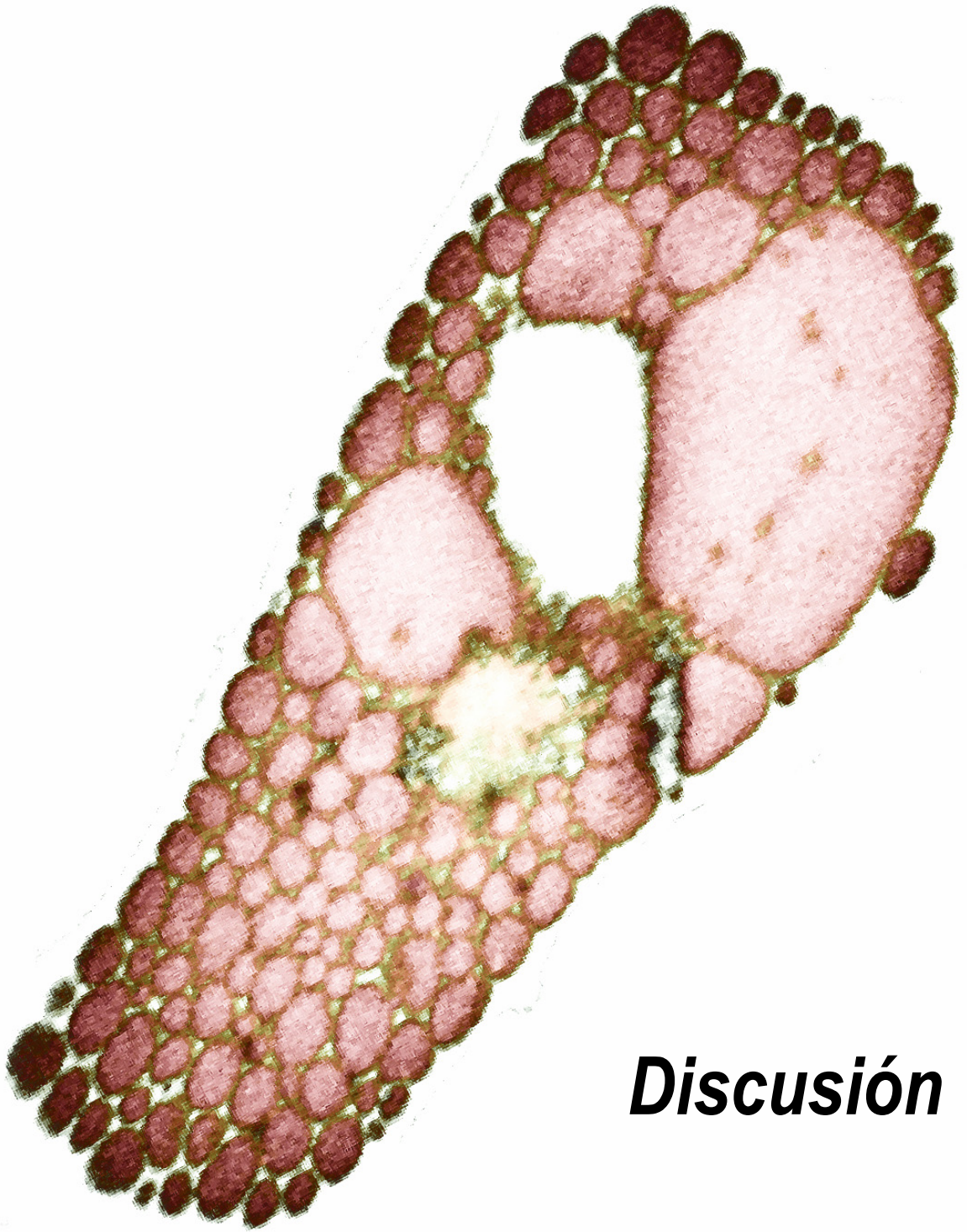


Figura 43. Modelo de nuevas funciones de Bak en el RE. 1.) Reestructuración de membranas reticulares. 2.) Inducción de apoptosis mitocondrial a través de IRE1/TRAF2 y calcio.



Discusión

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE UNA NUEVA ACTIVIDAD DE BAK AUSENTE EN EL HOMÓLOGO BAX

Como ya se ha concluido en el apartado de Resultados, la sobreexpresión de Bak y Bcl-X_L induce vacuolización citoplasmática y dilatación de las cisternas del RE. Este fenómeno se recapitula tras la activación de Bak endógeno en respuesta a activadores clásicos como Bim y tBid, aunque, en este caso, el fenotipo se revela únicamente en presencia de inhibidores de los canales de calcio RyR.

1.1. LA SOBREEXPRESIÓN COMO ESTRATEGIA PARA EXPLORAR FUNCIONES E INTERACCIONES NUEVAS

La sobreexpresión es una estrategia que se ha empleado ampliamente para explorar la función de diferentes proteínas implicadas en vías de señalización, aunque la expresión excesiva puede conllevar la inducción de fenotipos artificiales. El hecho de que en nuestro sistema Bak endógeno sea capaz de transmitir los cambios reticulares iniciados por miembros de la subfamilia BH3-*only* (Figura 27), argumenta en contra de un origen artificial del fenotipo inducido por la sobreexpresión de Bak y Bcl-X_L, apuntando a una función relevante y nueva de Bak en la regulación de la estructura del RE.

1.2. BAK NECESITA UN PASO DE ACTIVACIÓN ESPECÍFICO PROPORCIONADO POR BCL-X_L

Nuestros datos sugieren que Bak necesita un paso de activación proporcionado por Bcl-X_L para adquirir un estado funcional nuevo. Como se ha mencionado en la Introducción, Bcl-X_L es capaz de inhibir la actividad proapoptótica clásica de Bak a través del secuestro de su dominio BH3 (Chittenden, Flemington et al. 1995). En nuestro sistema, sin embargo, Bcl-X_L no solamente parece bloquear este potencial proapoptótico de Bak, ya que la sola inhibición del proceso de apoptosis inducido por Bak no es suficiente para generar el fenómeno de vacuolización. Esto viene demostrado por experimentos en los que diferentes inhibidores de caspasas no fueron capaces de generar el mismo fenotipo que causa Bak en presencia de Bcl-X_L (Figura 14A). Por tanto, la función proapoptótica de Bak tiene que ser específicamente inhibida por Bcl-X_L, indicando que Bcl-X_L no solamente actúa sobre Bak bloqueando el proceso de apoptosis, sino que también activa a Bak de una forma adicional, quizá mediante un cambio conformacional. Una vez activado, Bak es capaz de ejercer una función nueva, independiente de su

actividad proapoptótica, que se revela macroscópicamente en una capacidad para inducir la reorganización de las cisternas reticulares. Además, el hecho de que un mutante de Bak, que carece precisamente del dominio BH3 (Bak Δ BH3), mantenga el potencial de generar vacuolas autónomamente (Figura 16B), sugiere que la ausencia del dominio BH3 podría provocar un cambio intramolecular parecido al inducido por la unión de Bcl-X_L a Bak silvestre.

1.3. BAK LOCALIZADO EN MEMBRANAS RETICULARES INDUCE LA VACUOLIZACIÓN Y DILATACIÓN DEL RE

Como se menciona en la Introducción, los miembros de la familia Bcl-2 pueden estar localizados tanto en la mitocondria como en el RE. En nuestro sistema, experimentos de IF muestran que las moléculas Bak, Bak Δ BH3 y Bcl-X_L, que provocan el fenómeno de vacuolización reticular, están físicamente relacionadas con los márgenes de las vacuolas citoplasmáticas y, por tanto, con el RE dilatado (Figura 19). En concordancia con esto, experimentos de expresión específica de Bak en los dos orgánulos mostraron que la subpoblación de Bak que es activa en este contexto es la localizada en el RE, dado que la versión cb5 (Bak Δ BH3-cb5) retiene el potencial de vacuolización casi completamente, mientras que la versión presente en membranas mitocondriales (Bak Δ BH3-Acta) muestra una menor actividad (Figura 20B). De hecho, casi se puede descartar una contribución total de la fracción mitocondrial de Bak, puesto que experimentos control mostraron claramente que la versión ActA no era exclusivamente mitocondrial, sino en gran parte localizada en membranas reticulares. Esto explicaría por qué Bak Δ BH3-ActA induce, al menos en células 293T, todavía un porcentaje sustancial de células vacuolizadas. Por tanto, Bak localizado en el RE, y no en otro sitio intracelular, es probablemente la molécula que tiene un impacto directo en la estructura del orgánulo.

1.4. IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS BH

Nuestros datos indican que Bak ejerce una nueva función remodeladora del RE, y que su dominio BH3 juega un papel inhibitorio en esa capacidad, mientras que el dominio BH1 presenta un potencial activador, o al menos favorable, para el fenómeno. Estos datos son compatibles con la noción de que las moléculas de la familia Bcl-2 juegan papeles alternativos a la regulación de la apoptosis. Esta idea no es sorprendente, puesto que en los últimos años se han hecho avances considerables en el estudio del papel de la familia Bcl-2 en otros procesos fisiológicos además de la apoptosis. Por ejemplo, se ha descrito un papel de Bad en la regulación del metabolismo de la glucosa (Danial, Gramm et al. 2003) y en el control de la secreción de insulina en células beta pancreáticas (Danial, Walensky et al. 2008). Bak y Bax, a su vez, han sido involucrados en la modulación de la UPR a través de una asociación directa con IRE1 α

(Hetz, Bernasconi et al. 2006). Además, estas funciones no apoptóticas están mediadas, en parte, por los dominios conservados BH (Hetz, Bernasconi et al. 2006; Danial, Walensky et al. 2008). También se sabe que el dominio BH3 puede adquirir funciones adicionales a la inducción de muerte celular. Así, tanto la isoforma de Bak específica de neuronas (N-Bak), que contiene sólo el dominio BH3, como una versión diseñada de Bax con sólo el dominio BH3, tienen actividades anti-apoptóticas en neuronas, mientras que en células no neuronales ejercen un papel proapoptótico similar a proteínas BH3-*only* clásicas (Sun, Yu et al. 2001; Sun, Yu et al. 2003). Asimismo, la delección del dominio BH1 de la proteína Bcl-2, pero no delecciones de otros dominios, puede acelerar apoptosis (Kawatani e Imoto 2003). No obstante, la delección de dominios enteros en lugar de la generación de mutantes puntuales, alberga el riesgo de alterar gravemente el plegamiento, las asociaciones proteicas y, por tanto, el comportamiento fisiológico de la proteína, lo cual debe ser tenido en cuenta en la interpretación del experimento.

1.5. LA ACTIVIDAD DE BAK PARA PROVOCAR REMODELACIÓN DEL RE NO ES COMPARTIDA POR SU HOMÓLOGO FUNCIONAL BAX

Como ya se ha mencionado en la Introducción, existe una amplia redundancia funcional entre los dos homólogos Bak y Bax. Por ejemplo, células deficientes en sólo uno de los genes permanecen sensibles a múltiples estímulos apoptóticos, mientras que células deficientes en ambos agonistas adquieren una resistencia muy acusada (Cheng, Wei et al. 2001; Wei, Zong et al. 2001; Zong, Lindsten et al. 2001). Además, sólo los ratones dobles deficientes manifiestan fenotipos agudos (Lindsten, Ross et al. 2000). Así, Bak y Bax son esenciales para el desarrollo normal de múltiples tejidos (Lindsten, Ross et al. 2000), la homeostasis de células B y la prevención de enfermedades autoinmunes (Takeuchi, Fisher et al. 2005), y también para la proliferación de células T a través del control de la homeostasis del calcio (Jones, Bui et al. 2007). Asimismo, se ha sugerido que Bak y Bax pueden jugar papeles reguladores en otros tipos de muerte celular, como por ejemplo en muerte de tipo autofágico a través de mTor (Moretti, Attia et al. 2007).

En concordancia con esta redundancia funcional, se ha adscrito a estas moléculas un rango solapante de actividades celulares. Por ejemplo, ambos mediadores inducen apoptosis mitocondrial al insertarse en la membrana exterior de la mitocondria, y ambos presentan capacidad de oligomerización y de facilitar finalmente la salida de citocromo c del espacio intermembrana (Cory, Huang et al. 2003). De forma similar, ambas proteínas parecen mediar la apoptosis a través del RE inducida por activadores comunes como por ejemplo Bik (Mathai, Germain et al. 2005), una función que es facilitada por la activación de los canales IP₃R y la salida de calcio de las cisternas reticulares (Nutt, Pataer et al. 2002; Oakes, Scorrano et al. 2005). Además, ambas proteínas pueden ser activadas directamente por estímulos menos estudiados, como por ejemplo por calor (Pagliari, Kuwana et al. 2005), por la fosforilación oxidativa

(Tomiya, Serizawa et al. 2006), ciertas toxinas (Yamasaki, Wada et al. 2006) o la proteína proapoptótica Bnip3 (Kubli, Ycaza et al. 2007).

Sin embargo, nuestros estudios llevados a cabo en células MEF deficientes en Bax o Bak, muestran que los cambios morfológicos del RE están causados exclusivamente por la molécula Bak, pero no por Bax (Figura 27). Esto sugiere que las dos proteínas no siempre comparten actividades celulares redundantes, y, además, indican que Bak presenta funciones específicas en el RE.

Actividades únicamente ejercidas por uno de los homólogos en una situación celular concreta son excepcionales, pero algunos ejemplos han sido descritos. Así, algunos estímulos de muerte celular, como la proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 Bcl_x_S (Lindenboim, Kringel et al. 2005) o el derivado de esfingolípidos N-acetylhytosphingosina (NAPS) (Han, Kim et al. 2006), Granzima B (Wang, Wieckowski et al. 2001), algunas gliotoxinas (Pardo, Urban et al. 2006) o múltiples fármacos antitumorales (Wang, Gastman et al. 2001), requieren Bak, pero no Bax, para la inducción de apoptosis a través de la mitocondria. Asimismo, otros estudios apuntan a un papel único de Bak en la fragmentación mitocondrial mediada por mitofusinas (Brooks, Wei et al. 2007). En cambio, hay trabajos que favorecen la idea de Bax como requisito único en la apoptosis inducida por fármacos antitumorales o antiinflamatorias (Zhang, Yu et al. 2000), o por estímulos tanto apoptóticos (Bik, Bid, TNFR, TRAIL, Fas) como citotóxicos (radiación ultravioleta, STS, TG) (Theodorakis, Lomonosova et al. 2002; Gillissen, Essmann et al. 2003), virus (mixoma M11L, (Su, Wang et al. 2006)), o el factor de transcripción Myc (Dansen, Whitfield et al. 2006). Además, existen modelos en los que se ha comprobado que Bak y Bax muestran una dependencia mutua. Por ejemplo, en neuronas, la isoforma de Bak, N-Bak, induce apoptosis dependiente de Bax (Uo, Kinoshita et al. 2005). Durante algunas infecciones o apoptosis inducida por daño en el ADN (patógeno *Neisseria gonorrhoeae* o cisplatino, respectivamente) (Kepp, Rajalingam et al. 2007), existe una activación secuencial de los dos homólogos, de manera que la activación de Bak precede la de Bax, que finalmente induce la salida de citocromo c. De este modo, la regulación de Bak puede depender de Bax, por ejemplo en el caso de la regulación por VDAC-2 (Chandra, Choy et al. 2005).

Adicionalmente, algunas proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 parecen tener preferencias de unión para uno de los dos homólogos multidominio. Por ejemplo, Mcl-1 y Bcl-X_L inhiben preferentemente a Bak, mientras que Bcl-B muestra especificidad por Bax (Zhai, Jin et al. 2008). Asimismo, Mcl-1 puede determinar la dependencia de Bax (pero no de Bak) de la apoptosis inducida por Bik (Gillissen, Essmann et al. 2007). Por tanto, aunque Bak y Bax presenten un alto grado de redundancia funcional, existen ejemplos de actividades ejercidas por sólo una de las moléculas, indicando que este solapamiento puede no ser un fenómeno general. Nuestros datos parecen confirmar esta idea.

1.6. LA REESTRUCTURACIÓN DEL RE COMO CONSECUENCIA DE UNA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR BAK

Según el modelo ya ampliamente aceptado sobre el funcionamiento de las cascadas apoptóticas, las moléculas BH3-*only* están localizadas epistáticamente en un nivel superior a Bak y Bax en la vía señalizadora, de forma que son activadores de los dos homólogos proapoptóticos (Bouillet y Strasser 2002). Este orden parece mantenerse en nuestro sistema, puesto que Bim y tBid son capaces de inducir la dilatación reticular en presencia de Bak endógeno, pero no lo hacen en su ausencia (Figura). Sin embargo, los miembros BH3-*only* activarían a Bak para que ésta pueda ejercer una función que adicionalmente necesita un paso de activación por Bcl-X_L, lo que implica interacciones proteicas complejas cuya naturaleza todavía desconocemos. En cualquier caso, la actividad que hemos adscrito a Bak probablemente necesite la formación de complejos entre Bak y Bcl-X_L. Esta idea se ve apoyada por nuestros datos mostrando que la carencia del dominio BH3 en un mutante de Bak (BakΔBH3), es decir, la ausencia de la región de unión e inhibición de Bcl-X_L en Bak (Chittenden, Flemington et al. 1995) induce vacuolización en una magnitud similar a Bak y Bcl-X_L (Figura 16B).

Como ya se ha descrito anteriormente, el mecanismo fisiológico de activación de Bak y Bax por los miembros BH3-*only* aún no se ha podido esclarecer de todo, aunque actualmente se favorece el modelo de activación indirecta, según el cual las proteínas BH3-*only* se unirían preferentemente a los miembros antiapoptóticos, impidiendo así su acción inhibitoria sobre Bak y Bax (Adams y Cory 2007; Willis, Fletcher et al. 2007). Esto significa que, en el escenario de inducción de apoptosis, Bak y Bax no requieren de una activación directa mediante proteínas BH3-*only*, e implica que en células viables la actividad de Bak tendría que estar inhibida constitutivamente mediante la unión a proteínas antiapoptóticas como Bcl-X_L. Pero esta posibilidad plantea algunos problemas. Por ejemplo, el dominio BH3 de Bak está estructuralmente oculto y difícilmente accesible, y para poder exponer este dominio y unirse a Bcl-X_L, Bak necesita un cambio conformacional (Sattler, Liang et al. 1997), un cambio que se cree que inducen las proteínas Bim y tBid (Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Wei, Lindsten et al. 2000; Letai, Bassik et al. 2002), cuya actividad en estado basal es necesariamente baja. Para resolver esta contradicción, el modelo que se ha propuesto es que, en células viables, una porción de Bak estaría en un estado preactivado en el que el dominio BH3 estaría expuesto pero su actividad proapoptótica inhibida por proteínas antiapoptóticas (Willis, Chen et al. 2005). En este contexto, las proteínas BH3-*only* simplemente competirían con Bak por la unión a Bcl-X_L.

Por tanto, y teniendo en cuenta estas limitaciones, la transducción de señales en nuestro caso podría llevarse a cabo de varias maneras:

(1) Según el modelo de activación indirecta, Bak estaría preactivado en complejos ya existentes entre Bak y Bcl-X_L, localizados en membranas reticulares. En presencia de Bim o tBid, Bak preactivado se liberaría de Bcl-X_L conservando aún su estado funcional para inducir la actividad reticular. Varios ejemplos

en la bibliografía respaldan este modelo, puesto que han mostrado una asociación preexistente de Bak con Bcl-X_L que se rompe en respuesta a un estímulo apoptótico (por ejemplo: (Griffiths, Dubrez et al. 1999; Castilla, Congregado et al. 2006; Shimazu, Degenhardt et al. 2007; Willis, Fletcher et al. 2007)).

(2) Según el modelo de activación directa (más improbable), las proteínas BH3-*only* activarían Bak para que éste pueda exponer su dominio BH3 y unirse a Bcl-X_L e inducir su función de remodelación reticular.

(3) La molécula relevante fisiológicamente podría ser una isoforma fisiológica de Bak que carece del dominio BH3 (y no Bak completo), cuya existencia ya se ha descrito (Kim, Kim et al. 2004).

(4) Podría existir la formación de un complejo proteico nuevo que incluya simultáneamente las moléculas BH3-*only*, Bak y Bcl-X_L. En este sentido se cree que Bak funciona mayoritariamente como donador del dominio BH3. Sin embargo, la presencia en esta proteína de un surco hidrofóbico parecido al que está presente en Bcl-X_L hace que sea concebible la formación de un complejo en el que Bak se une a Bcl-X_L a través de la donación de su dominio BH3 y simultáneamente reciba en su surco hidrofóbico el dominio BH3 de las proteínas BH3-*only*. Aunque esta posibilidad sea estructuralmente compleja, su existencia no puede ser descartada completamente.

Como ya se ha descrito anteriormente, se cree que Bak sufre un cambio conformacional y una oligomerización durante su activación (Korsmeyer, Wei et al. 2000). Hasta qué punto Bak formaría oligómeros y permanecería posteriormente en este estado en nuestro sistema, queda todavía por determinar.

1.7. BASES MOLECULARES DE LA DILATACIÓN RETICULAR

El mecanismo bioquímico que subyace a la dilatación del RE en nuestro sistema es actualmente desconocido, aunque se pueden proponer varias posibilidades.

1.7.1. La implicación de cambios osmóticos y la contribución del calcio

Uno de los modelos sería que las cisternas reticulares se dilataran forzosamente por un incremento en la presión osmótica causado por un flujo de iones (y por tanto agua) desde el citoplasma o exterior celular hacia el RE, sea a través de canales de membranas existentes o poros inducidos específicamente por Bak, ya que se sabe que miembros de la familia Bcl-2 tienen la propiedad de formar poros (Antignani e Youle 2006). Dado que Bak puede regular los niveles de calcio en el RE (Nutt, Pataer et al. 2002; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003; Oakes, Scorrano et al. 2005), este ion podría estar implicado en un fenómeno osmótico de este tipo. Sin embargo, varios datos argumentan en contra de una implicación directa del calcio en nuestro sistema. En primer lugar, se ha visto que Bax tiene la misma capacidad de regular el calcio reticular que Bak (Nutt, Pataer et al. 2002; Scorrano, Oakes et al.

2003; Oakes, Scorrano et al. 2005), y es difícil pensar cómo una función específica de Bak pudiera ser mediada por una actividad reguladora común. En segundo lugar, hemos visto que las concentraciones de calcio presentes en el RE dilatado y en el citosol permanecen igual con respecto a células no alteradas (Figura 23A). Sin embargo, nuestros datos muestran un efecto potenciador de la dantrolina (Figura 21) y un efecto inhibitorio de la cafeína (Figura 22), apuntando a un papel regulatorio de los canales de calcio RyR. Dado que se sabe que la dantrolina reduce (Jacobs, Benders et al. 1991) y la cafeína incrementa (Ozawa 2001) el calcio citosólico, un modelo razonable sería que el calcio específicamente liberado por los canales RyR tiene la capacidad de contrarrestar las alteraciones reticulares. Asimismo, cabe destacar que los canales RyR también pueden dejar pasar otros iones además del calcio (Fill y Copello 2002), lo que suscita la posibilidad de que iones alternativos pudieran estar involucrados en una posible base osmótica del fenómeno.

1.7.2. La implicación de la proliferación de la membrana reticular

Otra posibilidad que explicaría las bases moleculares de la dilatación reticular implicaría un mecanismo más activo. Se ha visto que en la muerte celular lipotóxica, es decir, en situaciones de sobrecarga celular con lípidos (que se pueden inducir experimentalmente, por ejemplo, por el tratamiento de células con palmitato) la estructura reticular pierde su integridad (Borradaile, Han et al. 2006). Este exceso de palmitato induce no solamente la acumulación de ROS intracelulares, estrés reticular y finalmente muerte celular, sino que también inhibe la función del RE al incorporarse este lípido a las membranas reticulares, ocasionando la dilatación dramática del orgánulo y la redistribución de chaperonas reticulares al citosol (Borradaile, Han et al. 2006). Por tanto, en nuestro sistema Bak podría promover de forma directa o indirecta la síntesis *de novo* de diferentes lípidos o la incorporación de lípidos preexistentes, de forma que favorecería la proliferación de la membrana reticular.

1.8. POSIBLES FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CAPACIDAD DE BAK PARA REMODELAR LAS MEMBRANAS RETICULARES

Como ya se ha mencionado anteriormente, las técnicas de sobreexpresión pueden dar pistas sobre la función fisiológica de una proteína determinada. En nuestro caso, el fenómeno de vacuolización citoplasmática y dilatación de cisternas reticulares es un fenotipo específicamente inducido por Bak reticular activado por Bcl-X_L, aunque en su apariencia probablemente muy exagerado por la propia metodología de sobreexpresión de las moléculas. Aun no sabiendo la función fisiológica de este cambio drástico en la estructura del RE, surgen varias posibilidades.

1.8.1. La contribución a procesos de muerte celular

En muchas ocasiones se ha visto que diferentes procesos de muerte celular, como es la autofagia, la muerte celular no-lisosomal o la muerte citoplasmática (Van Cruchten y Van Den Broeck 2002), pueden verse acompañados por cambios en la morfología del RE, incluyendo la vacuolización y dilatación masiva del orgánulo. Además, durante apoptosis inducida, por ejemplo por microinyección de citocromo c (Chang, Phelps et al. 2000), STS en presencia de z-VAD-fmk (Johnson, Ko et al. 2000) o inhibidores de fosfatasa (Weller, Malipiero et al. 1995), el RE sufre también una dilatación acusada y el desplegamiento de sus cisternas (Herrera, Harlan et al. 2000; Muriel, Lambeng et al. 2000; Zeng y Xu 2000). Esto sugiere que la homeostasis del RE y el control de su volumen son actividades que se modulan de forma dramática durante diferentes tipos de muerte celular, abriendo la posibilidad a que tenga un efecto facilitador del proceso de muerte. En consistencia con esta posibilidad, un mutante de Bak que carece del dominio BH3, y cuya sobreexpresión en nuestro sistema es capaz de inducir dilatación del RE (Figura 16B), incrementa en otro estudio la susceptibilidad a muerte celular en respuesta a fármacos quimioterapéuticos (Simonian, Grillot et al. 1997), lo que sugiere una conexión entre los dos fenómenos. De hecho, este mutante existe fisiológicamente (*Bak-like*, una isoforma producida por *splicing* alternativo), y es capaz de matar células en estudios de sobreexpresión, aunque con menos potencial que Bak silvestre (Kim, Kim et al. 2004), indicando que el dominio BH3 no siempre es el único responsable de la actividad proapoptótica. Además, Bcl-X_L no siempre inhibe muerte celular, sino que en algunos sistemas simplemente redirige la apoptosis a formas alternativas de muerte, como son la necrosis (Shinoura, Yoshida et al. 1999) o la autofagia (Kim 2005). Esto sería compatible con datos nuestros (no mostrados), que indican que con el tiempo (a partir de las 60 horas de transfección) las células que presentan vacuolización y dilatación del RE se mueren de una forma probablemente no-apoptótica.

1.8.2. La implicación en la vía secretora y la UPR

Por otro lado, se sabe que durante la inducción de la respuesta celular a proteínas desplegadas (UPR) se producen alteraciones en la morfología del RE que recapitulan las observadas en nuestro sistema, ya que se manifiestan en una expansión e incremento del volumen reticular (Ron y Walter 2007). Estos cambios son debidos a una ampliación extensa de la vía secretora, que permite a la célula incrementar su capacidad de plegamiento y modificación de proteínas en función de su necesidad. Además, en situaciones en las que el funcionamiento de la vía secretora del RE o el proteasoma está interrumpido (como por ejemplo por el inhibidor BFA que bloquea el transporte del RE al aparato de Golgi, o fármacos antitumorales como geldamicina o velcade), también se produce una acumulación de proteínas desplegadas en el RE, provocando la dilatación y vacuolización del orgánulo (Alvarez y Sztul 1999; Mimnaugh, Xu et al. 2006).

Todos estos datos sugieren que la capacidad de Bak para inducir remodelación reticular podría reflejar un efecto estimulador de la vía secretora. De hecho, recientemente se ha descrito que Bak y Bax juegan un papel esencial en la inducción de la UPR a través del sistema IRE1 α y TRAF2 (Hetz, Bernasconi et al. 2006). Una vez activado este sistema, el factor de transcripción XBP-1 (una diana directa de IRE1 α activado) induce la expresión de múltiples genes implicados en las vías secretoras, la biogénesis de fosfolípidos y la expansión del RE (Shaffer, Shapiro-Shelef et al. 2004; Sriburi, Jackowski et al. 2004; Lee, Chu et al. 2005). Además, se ha visto que, en respuesta a estrés reticular, Bak es capaz de regular la expansión de membranas reticulares a través de IRE1 y XBP-1 (Hetz, Bernasconi et al. 2006). Este efecto es independiente de la actividad caspasa y recuperable por la reconstitución de células DKO con Bak silvestre o Bakcb5 (Yoshida, Matsui et al. 2001; Calfon, Zeng et al. 2002; Hetz, Bernasconi et al. 2006). Por tanto, Bak reticular podría alterar la estructura del RE mediante la modulación de componentes de la UPR como IRE1, que a través de XBP-1 induciría el fenotipo de dilatación reticular observado en nuestro sistema. Sin embargo, esta hipótesis presenta ciertos problemas. Por ejemplo, se ha descrito que los dominios BH3 y BH1 de Bak y Bax son necesarios para la interacción y unión de las moléculas proapoptóticas con IRE1 (Hetz, Bernasconi et al. 2006), mientras que en nuestro sistema el dominio BH3 de Bak tiene un efecto inhibitorio. Además, Bak debe ser activado de forma adicional por Bcl-X_L para inducir vacuolización, por lo que este dominio probablemente no esté a disposición de IRE1 para favorecer la cascada de señalización. Por otro lado, se ha descrito que Bax también modula IRE1 durante estrés reticular (Hetz, Bernasconi et al. 2006), por lo cual es difícil imaginar cómo una función específica de Bak pudiera ser regulada de forma igual por los dos homólogos.

1.8.3. El papel de Bak reticular en la fusión de membranas

Alternativamente, Bak reticular podría participar en procesos relacionados con la fusión de membranas favoreciendo así la generación del fenotipo vacuolizado. Por ejemplo, se ha visto que otro miembro de la familia Bcl-2, la proteína BH3-*only* Bnip1, participa en la formación y modulación de la red reticular, y está involucrado en la fusión (pero no en el tráfico) de membranas entre el RE y el aparato de Golgi. Además, el dominio BH3 de Bnip1 es importante para la unión de esta molécula a un complejo proteico que comprende algunas proteínas de la familia SNARE que se localizan en el RE y juegan un papel clave en el proceso de fusión de membranas (Nakajima, Hirose et al. 2004; Jahn y Scheller 2006).

1.8.4. La contribución a la morfogénesis de orgánulos

Por último, recientemente se ha descrito que la expresión de Bak y Bax es esencial para la morfogénesis de la mitocondria (Karbowski, Norris et al. 2006; Wasiak, Zunino et al. 2007), lo que sugiere que estas proteínas podrían tener efectos reguladores en la morfogénesis de otros orgánulos como el RE.

2. ESTUDIO DEL PAPEL DE BAK RETICULAR EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA

2.1. MOLÉCULAS BH3-ONLY ACTIVAN A BAK RETICULAR PARA INDUCIR APOPTOSIS. ¿PAPEL FACILITADOR DEL RE EN APOPTOSIS O SITIO DE INDUCCIÓN AUTÓNOMO?

Según nuestros datos, ciertas proteínas BH3-*only* (Bim_{EL} y Puma, pero no tBid) son capaces de mediar apoptosis específicamente a través de Bak reticular para desencadenar la vía apoptótica mitocondrial (Figuras 33 y 34). Esto apunta a un papel relevante del RE en la integración de señales apoptóticas transmitidas por proteínas BH3-*only*.

Aunque la localización reticular de Bak y su papel como inductor de diversas vías apoptóticas iniciadas desde el RE ya se habían descrito (Wei, Zong et al. 2001; Nutt, Pataer et al. 2002; Breckenridge, Germain et al. 2003; Scorrano, Oakes et al. 2003; Zong, Li et al. 2003; Rong y Distelhorst 2007), aún no se había explorado si la presencia exclusiva de Bak o Bax en las cisternas reticulares es suficiente para inducir el proceso apoptótico. Los ejemplos descritos en la bibliografía se restringían hasta ahora a mostrar que algunas moléculas BH3-*only* están localizadas en el RE y son capaces de promover apoptosis desde este orgánulo en células que típicamente expresan también Bak y Bax en las membranas mitocondriales. En este contexto, se sabe que Puma media apoptosis a través del calcio reticular (Shibue, Suzuki et al. 2006), Bim se transloca a membranas reticulares en respuesta a estrés del RE y promueve la activación de caspasa 12 (Morishima, Nakanishi et al. 2004), Spike (un miembro de la familia menos estudiado) se localiza en el RE y regula el procesamiento de Bap31 para inducir apoptosis mitocondrial (Mund, Gewies et al. 2003), y Bik induce la oligomerización de Bak reticular y la salida de calcio, participando así en la muerte celular inducida por p53 (Mathai, Germain et al. 2005). Nuestro trabajo ha permitido esclarecer hasta qué punto el RE puede inducir señales apoptóticas mediadas por proteínas BH3-*only* de una forma autónoma, en ausencia de Bak y Bax mitocondriales. Así, dado que nuestros datos se han obtenido en células MEF que únicamente expresan Bak en el RE (en lugar de en células silvestres como las que se han usado en la gran mayoría de los estudios publicados) podemos concluir que Bak reticular puede inducir apoptosis mitocondrial (la salida de citocromo c y la activación de caspasas efectoras) a través de una vía que opera en ausencia de Bak y Bax mitocondriales. Por tanto, esta ruta funciona de una forma autónoma de la maquinaria apoptótica convencional encargada de movilizar el citocromo c de las mitocondrias.

Hasta qué punto esta ruta reticular es relevante en células normales que sí presentan una expresión sustancial (de hecho mayoritaria en comparación con el RE) de Bak en las membranas mitocondriales, queda todavía por determinar. No obstante, algunas proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 como Bcl-2 o Bcl-X_L parecen tener diferentes distribuciones subcelulares y desigual capacidad protectora en los diferentes compartimentos (Kaufmann, Schlipf et al. 2003; Fiebig, Zhu et al. 2006), sugiriendo la posibilidad de que en determinadas circunstancias la vía mitocondrial pueda estar bloqueada, de forma que la vía apoptótica reticular que nosotros hemos identificado adquiriera más prominencia funcional.

2.2. IRE1/TRAF2 Y LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO RETICULAR SON REQUISITOS PARA LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS A TRAVÉS DE BAK RETICULAR

Nuestros datos indican que determinadas proteínas BH3-*only* son capaces de activar la vía apoptótica mitocondrial a través de una señalización que implica tanto a componentes del sistema de respuesta al estrés reticular (IRE1 α /TRAF2) como la movilización del calcio presente en las cisternas del RE. En relación a esto, pueden hacerse varias consideraciones.

2.2.1. Bakcb5 reestablece los niveles de calcio en el RE

En primer lugar, hemos podido comprobar que el nivel de calcio reticular en los clones que expresan Bakcb5 se ve incrementado con respecto a las células parentales DKO, acercándose a los presentes en células silvestres (Figura 31). Este resultado confirma datos publicados previamente que demuestran que los homólogos Bak y Bax tienen la capacidad de mantener los niveles fisiológicos de calcio en el RE (Scorrano, Oakes et al. 2003; Oakes, Lin et al. 2006).

2.2.2. El calcio es necesario pero insuficiente para mediar la respuesta apoptótica inducida por Bak reticular

Nuestros datos indican que, en respuesta a la expresión de proteínas BH3-*only* (como Bim_{EL} y Puma), la movilización de calcio reticular es necesaria pero insuficiente para inducir la vía apoptótica a través de mitocondrias carentes de Bak y Bax. Esto viene avalado por experimentos que muestran que agentes movilizadores de calcio del RE son por sí solos incapaces de inducir la salida de citocromo c en células que expresan Bakcb5 (Figuras 39 y 40). Al mismo tiempo, el tratamiento con inhibidores de calcio intracelular como 2-APB o Bapta-AM, inhibe apoptosis mitocondrial inducida por Bim_{EL} Δ TMcb5 y Pumacb5 (movilización de citocromo c y activación de las caspasas 9 y 3) (Figura 41).

Estos datos relacionan varias observaciones previamente descritas en la bibliografía. Por un lado, se sabe que Bak y Bax son capaces de movilizar calcio del RE en respuesta a estímulos que provocan estrés reticular, una actividad que se cree que contribuye a la inducción de apoptosis (Breckenridge, Germain et al. 2003; Oakes, Lin et al. 2006; Hetz 2007). Por otro lado, también se asume que la movilización de calcio reticular se asocia de forma genérica con una contribución a apoptosis (Oakes, Lin et al. 2006; Pizzo y Pozzan 2007; Giorgi, Romagnoli et al. 2008). Sin embargo, hasta ahora no se habían mostrado ejemplos en los que una señal apoptótica específica (como por ejemplo la acción de una proteína *BH3-only*) pueda inducir la liberación de calcio del RE con consecuencias apoptóticas directas, mediadas por Bak reticular. El único ejemplo existente hasta ahora describe que en células carentes de Bak y Bax, Bik no es capaz de liberar calcio del RE e inducir apoptosis (Mathai, Germain et al. 2005). Sin embargo, en este estudio no es posible distinguir si esta incapacidad de Bik se debe a la ausencia de Bak o a la baja concentración de calcio reticular que exhiben las células DKO. Nuestros resultados establecen la necesidad tanto de Bak reticular como de la movilización de calcio para inducir el fenómeno apoptótico.

Los datos mostrados sugieren que la movilización de calcio desde el RE inducida por Bim_{EL} y Puma se ve facilitada por los canales de exportación IP₃R, dado que experimentos con un inhibidor de estos receptores (2-APB) muestran una clara disminución inducida por este agente sobre los parámetros apoptóticos estudiados (Figura 41A). Sin embargo, la especificidad de este compuesto no está clara, ya que parece tener efectos más amplios en el metabolismo del calcio además de inhibir los IP₃R, probablemente interfiriendo también con el suministro de calcio desde el exterior de la célula (Bootman, Collins et al. 2002). Aunque se ha descrito ampliamente la implicación de canales IP₃R en la inducción de apoptosis, actualmente no podemos descartar la implicación de los canales RyR en nuestro sistema. Asimismo, considerando las propiedades de la familia Bcl-2 de insertarse y formar canales en membranas subcelulares, tampoco podemos descartar la posibilidad de que poros directamente inducidos por Bak pudieran mediar la movilización de calcio del RE en células que expresan Bakcb5.

2.2.3. Los componentes de la respuesta a estrés reticular IRE1/TRAF2 juegan un papel en la respuesta apoptótica desde el RE

El hecho de que la movilización de calcio reticular sea necesaria pero no suficiente para la transmisión de señales apoptóticas a la mitocondria en nuestro sistema sugiere la implicación de mecanismos adicionales. Nuestros datos demuestran la participación de un sistema que anteriormente se había vinculado únicamente a la apoptosis en respuesta a estrés reticular (IRE1/TRAF2). Así, se sabe que en situaciones de estrés reticular severo o irreparable, la célula puede iniciar apoptosis a través de la señalización de la vía IRE1/TRAF2/ASK1 y finalmente JNK (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002; Sekine, Takeda et al. 2006; Szegezdi, Logue et al. 2006; Wu y Kaufman 2006; Ron y Walter 2007). De hecho, se ha demostrado recientemente que los dos homólogos proapoptóticos Bak y Bax juegan un papel estabilizador y facilitador en la formación y señalización de este complejo proteico (Hetz, Bernasconi et al.

2006), indicando así que Bak es capaz de transmitir señales al sistema IRE/TRAF2 de una forma similar a la propuesta por nuestros estudios. Aun desconociendo si la señalización apoptótica a través de Bak e IRE/TRAF2 comparte completamente la ruta descrita en respuesta a estrés reticular, cabría pensar que la quinasa JNK pudiera jugar un papel en la activación de apoptosis en nuestro sistema.

2.2.4. La dependencia mutua de las dos vías de señalización IRE/TRAF2 y calcio para inducir apoptosis

Nuestros experimentos indican que tanto la señalización a través de IRE/TRAF2 como la movilización de calcio reticular son eventos necesarios para la inducción de apoptosis en células que expresan Bak en el RE. Aunque la contribución de cada componente resultó ser relativamente variable según el abordaje experimental, nuestros datos demuestran por primera vez la necesidad de dos rutas de señalización que se complementan mutuamente para la inducción de apoptosis desde el RE a través de Bak. Además, estas observaciones sugieren la existencia de una interacción funcional entre la salida de calcio del RE y el sistema IRE1/TRAF2. A qué nivel convergen estas dos vías para inducir apoptosis mitocondrial no está claro, aunque resulta factible imaginar que, de algún modo, el calcio pueda tener un efecto potenciador de la señalización dependiente de IRE/TRAF2 (o JNK) o funcione en sinergia con proteínas mitocondriales que favorezcan la movilización de citocromo c.

2.3. OTROS COMPONENTES IMPLICADOS EN LA COMUNICACIÓN APOPTÓTICA ENTRE EL RE Y LA MITOCONDRIA

A continuación se considerarán otros componentes celulares que podrían estar involucrados en la señalización apoptótica en nuestro sistema.

2.3.1. Implicación de moléculas relacionadas física o funcionalmente con el RE

2.3.1.1. La caspasa 12 y otras caspasas

Como ya se ha mencionado en la Introducción, se sabe que la caspasa 12 está localizada en el RE donde es activada por Bim y estrés reticular para inducir apoptosis, tanto de forma dependiente como independiente de la mitocondria (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Morishima, Nakanishi et al. 2002; Rao, Castro-Obregon et al. 2002; Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003; Morishima, Nakanishi et al. 2004). Además, esta proteasa interacciona directamente con el complejo de señalización de TRAF2 (Yoneda, Imaizumi et al. 2001), sugiriendo que podría participar en nuestro sistema para transmitir señales apoptóticas a la mitocondria. Sin embargo, hemos descartado una contribución de esta caspasa, puesto que no se procesa proteolíticamente en respuesta a la sobreexpresión de Bim_{EL} o Puma en células que expresan Bakcb5 (Figura 35). Además, todos los ensayos de citocromo c realizados en este estudio se llevaron a cabo en

presencia del inhibidor universal de caspasas z-VAD-fmk, un inhibidor también de la caspasa 12. Este resultado descarta la implicación tanto de la caspasa 12 como de otras caspasas (por ejemplo, la caspasa 8 y su isoforma la procaspasa 8L) como posibles moléculas señalizadoras entre el RE y la mitocondria. En cambio, la caspasa 2 es insensible a la acción inhibitoria de z-VAD-fmk y se ha visto que puede localizar en membranas reticulares (Mancini, Machamer et al. 2000; Cheung, Lynn Kelly et al. 2006; Murakami, Aizu-Yokota et al. 2007), abriendo la posibilidad de que estuviera implicada en nuestro sistema. Sin embargo, resultados obtenidos utilizando un inhibidor específico de esta caspasa descartaron también su participación (datos no mostrados).

2.3.1.2. Componentes de la vía de señalización dependiente de IRE1 α . La quinasa JNK

Hasta el momento desconocemos si la señalización apoptótica a través de IRE en el sistema que hemos estudiado comparte los elementos de la vía clásica de estrés reticular conocida o si está implicada una configuración nueva de esta ruta.

Un candidato obvio para la transmisión de la señal apoptótica desde el RE a la mitocondria podría ser JNK, puesto que esta quinasa se activa en respuesta al complejo activo IRE/TRAF2 y es capaz de provocar apoptosis en diferentes contextos (Tournier, Hess et al. 2000; Urano, Wang et al. 2000; Hetz 2007; Ron y Walter 2007; Weston y Davis 2007). Por ejemplo, JNK puede fosforilar proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-2 o Bim, y así favorecer la apoptosis (Lei y Davis 2003; Bassik, Scorrano et al. 2004; Muscarella y Bloom 2007). Además, JNK promueve la activación transcripcional a través de varios factores de transcripción (Bogoyevitch y Kobe 2006), por lo que algún efector activado transcripcionalmente por la vía de JNK podría estar implicado. De hecho, se ha descrito que tanto Bim como Puma se inducen en respuesta a estrés reticular (Reimertz, Kogel et al. 2003; Puthalakath, O'Reilly et al. 2007), lo que sugeriría que alguna de estas proteínas podría tener un papel si fueran capaces de actuar directamente sobre mitocondrias carentes de Bak y de Bax. Sin embargo, en nuestro sistema BimActA no tiene capacidad de movilizar el citocromo c de la mitocondria (Figura 38B) por lo que su implicación parece poco probable. En cambio, y de forma inesperada, PumaActA sí ha mostrado una actividad autónoma en la inducción de la salida de citocromo c en los clones que expresan Bakcb5 (Figura 38B) abriendo así la posibilidad de que *puma* inducido por la activación de Bak reticular pueda tener un papel apoptótico directo en la mitocondria. Sin embargo, esta posibilidad parece improbable, puesto que se ha visto que TG activa eficientemente tanto la vía de estrés reticular como la expresión de Puma (Luo, He et al. 2005), y sin embargo, TG no es capaz de activar la vía mitocondrial en los clones que expresan Bakcb5 (Figura 39). Aunque este tipo de implicación de Bim y Puma en nuestro sistema es poco probable, no se puede descartar la acción de una molécula BH3-*only* alternativa.

2.3.1.3 Moléculas que favorecen la interacción entre el RE y la mitocondria

Otros elementos que podrían mediar la comunicación apoptótica entre el RE y la mitocondria son aquellos componentes que mantienen un contacto cercano entre los dos orgánulos y que por tanto facilitan los flujos de calcio.

En primer lugar, se ha propuesto que este tipo de tránsitos de calcio se producen primordialmente en regiones de membranas reticulares en aposición muy cercana a mitocondrias, los llamados *close contacts*. Estos microdominios son sitios enriquecidos en receptores IP₃R (y supuestamente RyR) y presentan un contenido particularmente alto de calcio, por lo cual se les identifica como *hotspots* implicados en la liberación de cantidades altas de calcio del RE para su paso a la mitocondria (Rizzuto, Pinton et al. 1998; Rizzuto, Duchen et al. 2004). Se ha calculado que entre un 5 y un 20% de la superficie mitocondrial está en contacto cercano con el RE y forma parte de estos *close contacts* (Rizzuto, Pinton et al. 1998).

En segundo lugar, aparte de estas regiones de gran cercanía entre los dos orgánulos, el RE es capaz de establecer contactos físicos con la mitocondria a través de subdominios de membranas que están asociados con las mitocondrias, las denominadas MAM (membranas de origen reticular que se asocian con las mitocondrias) (Rusinol, Cui et al. 1994). La función primordial de los MAM es establecer y regular el tránsito de fosfolípidos entre los dos orgánulos (Vance 2003), pero recientemente también se les ha adscrito cierta importancia en el tránsito de calcio (Hajnoczky, Csordas et al. 2002). Esta suposición se ha basado en estudios que demuestran que el calcio del RE controla la actividad de la fosfatidilserina sintasa, en su mayor parte presente en estas membranas. Así, se ha propuesto que las MAM podrían representar subdominios del RE que medien el suministro efectivo de señales de calcio mediadas por canales IP₃R y RyR a la mitocondria (Hajnoczky, Csordas et al. 2002).

En tercer lugar, también podrían jugar un papel facilitador proteínas de las que se cree que forman puentes moleculares físicos entre los dos orgánulos, como por ejemplo la chaperona citosólica grp75 o la proteína PACS-2 (Pizzo y Pozzan 2007). En el caso de grp75, se ha visto que esta proteína interacciona simultáneamente con los IP₃R y VDAC, acoplado así los dos orgánulos (Szabadkai, Bianchi et al. 2006; Pizzo y Pozzan 2007). En lo que se refiere a PACS-2, se sabe que participa en la comunicación entre los dos orgánulos, regulando también la homeostasis del calcio reticular y la apoptosis. PACS-2 parece ejercer estas funciones a través del control de la aposición de la mitocondria con el RE, dado que la depleción de PACS-2 causa la fragmentación de las mitocondrias y su desacoplamiento del RE. Además, PACS-2 controla la formación de sitios sintetizadores de lípidos localizados en las membranas MAM.

2.3.2 Implicación de moléculas que facilitan la movilización del citocromo c al citoplasma

Uno de los asuntos que quedan pendientes de explorar en el sistema que hemos estudiado es la identificación de la maquinaria molecular que causa la salida de citocromo c de mitocondrias carentes de Bak y Bax. Hasta ahora sólo podemos considerar algunas posibilidades.

2.3.2.1 El papel del PTP

La existencia de un poro mitocondrial que media la salida de citocromo c en respuesta a sobrecargas de calcio en la mitocondria ya ha sido propuesto (Tsujiyama y Shimizu 2007). Este poro provoca una transición en las propiedades de permeabilidad de las membranas de la mitocondria que finalmente causa la entrada de agua, dilatación de la matriz mitocondrial y ruptura de la membrana externa con la consiguiente liberación de citocromo c (Tsujiyama y Shimizu 2007). Tradicionalmente se ha pensado que la composición mínima del PTP incluiría al transportador ANT, presente en la membrana interior, VDAC, presente en la membrana exterior, y ciclofilina D, en la matriz mitocondrial (Zamzami y Kroemer 2001; Crompton, Barksby et al. 2002). Este poro podría ser un candidato como mediador la movilización de citocromo c en nuestro sistema puesto que responde a tránsitos de calcio proveniente del RE. Sin embargo, nosotros hemos sido incapaces de detectar una inhibición de apoptosis inducida por Bim_{EL}ΔTMcb5 y Pumacb5 en células que expresan Bakcb5 en presencia de inhibidores comerciales de este poro, como el ácido bonkréuico o la ciclosporina A (datos no mostrados), excluyendo la posible implicación del PTP en apoptosis mitocondrial mediada por Bak reticular. Además, mientras que experimentos en ratones han confirmado la contribución de la ciclofilina D al poro (Nakagawa, Shimizu et al. 2005), otros experimentos de inactivación génica tanto de tres isoformas (pero no todas) del ANT (Kokoszka, Waymire et al. 2004; Dolce, Scarcia et al. 2005) como de VDAC (Baines, Kaiser et al. 2007), no han confirmado que estas proteínas sean esenciales para la formación del poro, por lo cual su composición e implicación en la liberación de citocromo c sigue siendo actualmente un tema de debate. Por tanto, la importancia de este canal en apoptosis es tema todavía controvertido.

2.3.2.2 Bak mitocondrial en los clones que expresan Bakcb5

Una posibilidad artefactual que explicara cómo Bak reticular induce apoptosis mitocondrial en nuestro sistema sería que las líneas celulares que expresen Bakcb5 presentaran niveles de Bak residuales en las mitocondrias, que resultaran funcionales pero que no fueran detectables por los métodos de localización subcelular usados. Sin embargo, esta idea se puede descartar casi por completo, dado que la presencia de una proteína proapoptótica como Bak o Bax en este orgánulo es suficiente para provocar la movilización de citocromo c al citosol en respuesta a tBid (Scorrano, Oakes et al. 2003). En nuestro sistema, sin embargo, tBid es incapaz de ejercer esta actividad en los clones que expresan Bakcb5 (Figura 34B). Por tanto, parece improbable que haya una porción funcional de Bak en las mitocondrias de las células que expresan Bakcb5.

2.3.2.3 Bcl-2 como molécula proapoptótica

Se ha propuesto previamente que Bcl-2, aun siendo una molécula bien conocida por su capacidad antiapoptótica, en ciertas circunstancias puede sufrir un cambio conformacional que le confiere capacidad para inducir la liberación del citocromo c del espacio intermembrana en células deficientes tanto en Bak como en Bax (Lei, Chen et al. 2006), abriendo la posibilidad de que Bcl-2 juegue un papel en la movilización de citocromo c en nuestro sistema. Esta hipótesis se ve apoyada por otros trabajos en los que se adscribe a Bcl-2 actividades proapoptóticas en vez de protectivas (Subramanian y Chinnadurai 2003; Kim 2005). Aunque el mecanismo a través del cual Bcl-2 ejerce esta función es desconocido, esta molécula podría formar, como se ha propuesto en el caso de Bcl-X_L, poros en la membrana mitocondrial y favorecer así la salida de citocromo c. Además, se ha visto que la fosforilación de Bcl-2 por JNK bloquea la capacidad antiapoptótica de Bcl-2 (Bassik, Scorrano et al. 2004; Muscarella y Bloom 2007) y puede favorecer la movilización de calcio del RE en vez de retenerlo (Bassik, Scorrano et al. 2004).

3. CONVERGENCIA DE LAS DOS FUNCIONES DE BAK RETICULAR

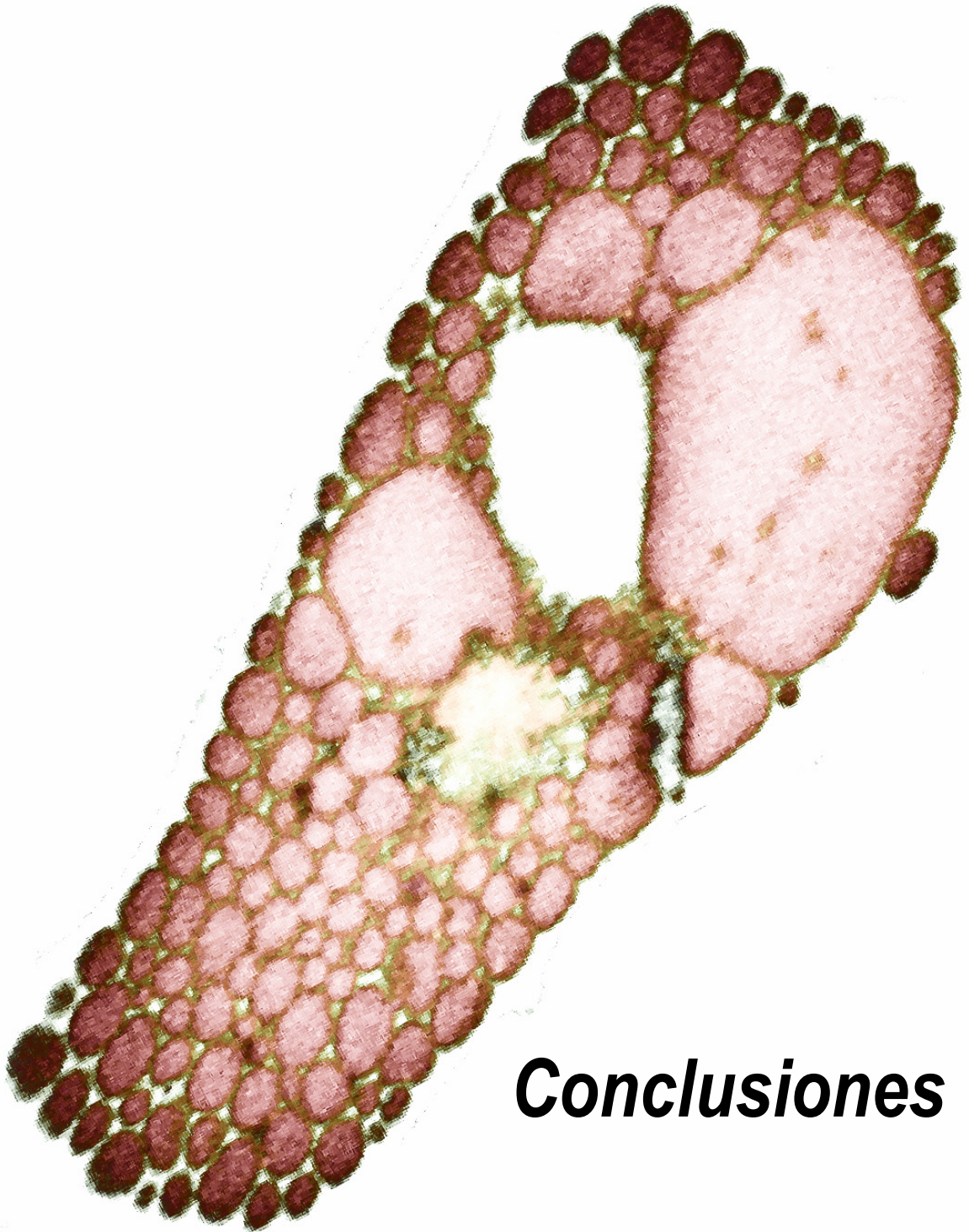
En esta tesis se han descrito dos funciones nuevas de Bak reticular. Por un lado, se ha visto que proteínas BH3-*only* pueden causar la remodelación de las membranas reticulares a través de Bak presente en este orgánulo. Por otro lado, Bak reticular es capaz de transmitir señales apoptóticas inducidas específicamente por proteínas BH3-*only* a través de IRE/TRAF2 y la movilización de calcio. Actualmente desconocemos si puede haber una relación directa entre ambos fenómenos, o si son dos eventos celulares no relacionados. Sin embargo, teniendo en cuenta todos los datos obtenidos en el marco de este trabajo, surge la pregunta de si estas dos actividades podrían converger funcionalmente. Algunas similitudes entre los dos fenómenos parecen apoyar esta posibilidad. Las discutiremos a continuación.

En primer lugar, Bak reticular ha sido descrito como parte del complejo señalizador IRE1/TRAF2 formado en la respuesta celular a situaciones de estrés en el RE, y que está implicado en la señalización de la UPR. Uno de los efectos de esta respuesta es la ampliación de la vía secretora provocada por el factor de transcripción XBP-1 activado por esta ruta (Hetz, Bernasconi et al. 2006). Así, esta vía señalizadora conlleva la fosforilación de JNK, la inducción transcripcional (dependiente de XBP-1) de enzimas involucradas en la biosíntesis de fosfolípidos y una dilatación de las cisternas reticulares similar a la observada en nuestro sistema (Sriburi, Jackowski et al. 2004; Hetz, Bernasconi et al. 2006). Por tanto, se podría concebir la idea de que las moléculas BH3-*only* podrían inducir una señalización mediada por Bak reticular a través del sistema IRE/TRAF2 que, dependiendo de las circunstancias, bien ocasionaría cambios en la membrana reticular o bien la inducción de apoptosis en combinación con flujos de calcio.

Sin embargo, sobre la base de nuestros datos, esta hipótesis presenta algunos problemas. Por ejemplo, mientras que el dominio BH3 de Bak es un factor inhibitorio en el contexto de la dilatación

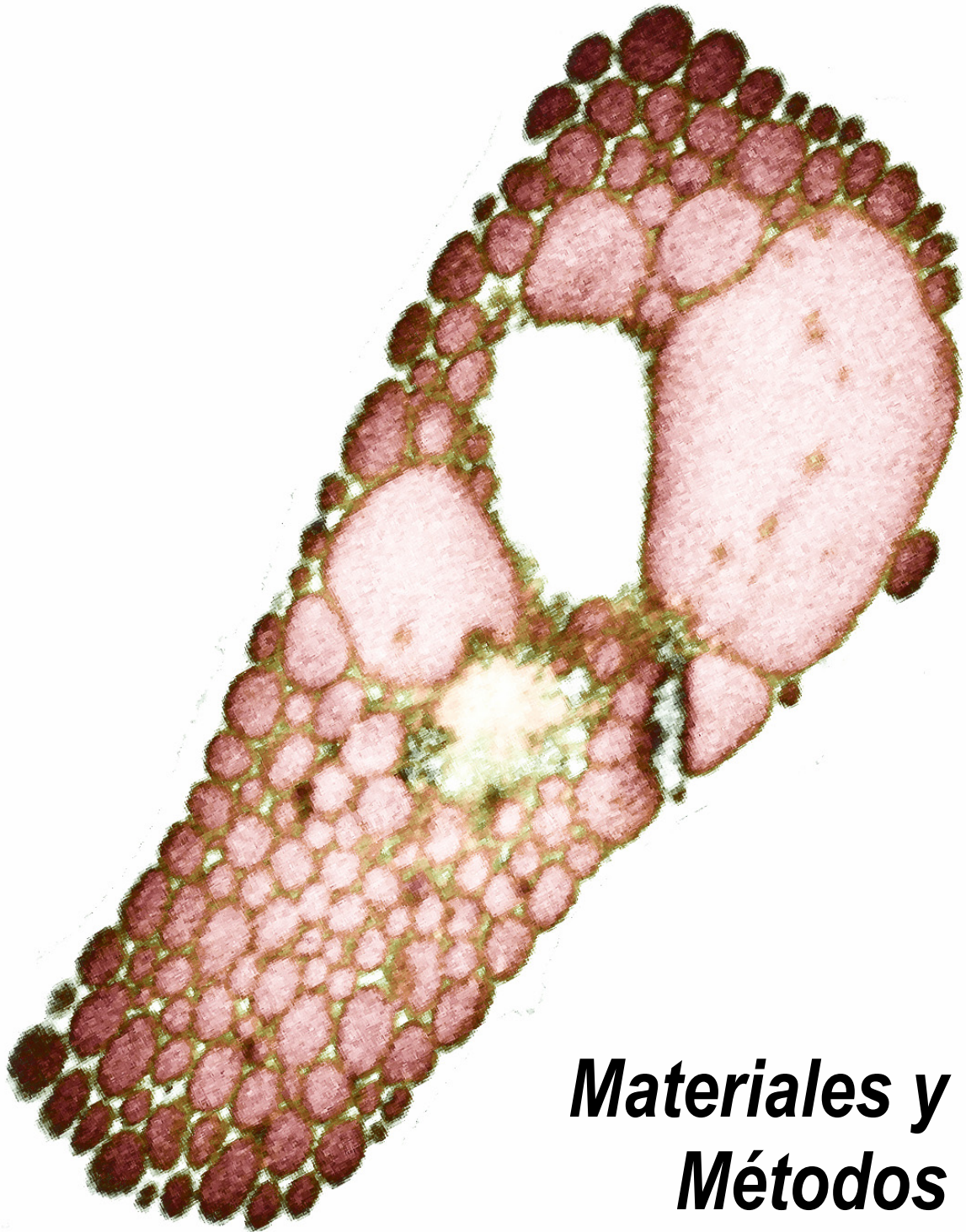
reticular, en el contexto de la señalización apoptótica parece ser necesario para su asociación a IRE1 (Hetz, Bernasconi et al. 2006). Además, tBid es inductor de la señalización en uno de los sistemas (dilatación), mientras que en el otro no es funcional (apoptosis). Asimismo, el calcio tiene un papel fundamental en la inducción de apoptosis pero en la generación de la dilatación del RE es probablemente marginal.

Resumidamente, los datos de esta tesis revelan dos funciones nuevas de Bak en membranas reticulares. En primer lugar Bak está implicado en regular la estructura (y posiblemente la biogénesis) del RE, y, en segundo lugar, Bak participa en la respuesta apoptótica desde este orgánulo de una forma autónoma, a través de mecanismos señalizadores que anteriormente se pensaba que eran exclusivos de la UPR.



Conclusiones

1. Bak sobreexpresado y específicamente activado por Bcl-X_L es capaz de inducir la dilatación y reestructuración del RE, una actividad que está ausente en la molécula homóloga Bax.
2. El dominio BH3 de Bak presenta un efecto inhibitor sobre la capacidad de Bak de regular la estructura del RE.
3. La actividad de remodelación de la estructura reticular reside en la subpoblación de Bak localizada en el RE.
4. Bak endógeno ejerce su actividad remodeladora de las cisternas reticulares en respuesta a moléculas BH3-*only*, como son Bim_{EL} y tBid.
5. La remodelación del RE es inhibida por la actividad de los canales de calcio de tipo RyR.
6. La expresión de Bak en el RE es suficiente para transmitir señales apoptóticas autónomas a mitocondrias carentes tanto de Bak como de Bax.
7. Bak reticular es activado específicamente por moléculas BH3-*only*, como Bim_{EL} y Puma, pero no tBid, para transmitir la señal apoptótica.
8. La ruta de señalización apoptótica activada por Bak desde el RE es dependiente de la movilización del calcio reticular y de los componentes del sistema de la respuesta a estrés reticular IRE1 y TRAF2.



***Materiales y
Métodos***

1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

1.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares HEK-293T (células de riñón embrionario humano, del inglés *human embryonic kidney-293T cells*), HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix de Henrietta Lacks) y Cos-7 (células de riñón de mono verde) procedieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC®, Rockville, MD). Las líneas celulares MEF (fibroblastos embrionarios murinos, del inglés *mouse embryonic fibroblasts*) inmortalizadas mediante transformación con SV-40 (del inglés *Simian Vacuolating Virus 40*), en concreto los MEF silvestres (*wt*, del inglés *wild-type*), los MEF deficientes en Bak (MEF-*bak*^{-/-}) o en Bax (MEF-*bax*^{-/-}) y los MEF carentes tanto de Bak como Bax (MEF-*bax*^{-/-}*bak*^{-/-} o MEF-DKO: del inglés *double knock-out*) fueron amablemente cedidas por el Dr. Stanley Korsmeyer (Harvard Medical School, Boston, MA) (Wei, Zong et al. 2001).

1.2. CULTIVO CELULAR

1.2.1. Mantenimiento de células

Las células HEK-293T, HeLa, Cos-7 y MEF, tanto silvestres como deficientes en Bak y/o Bax se cultivaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con L-glutamina (2mM, Gibco-Invitrogen), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100µg/ml) (Gibco-Invitrogen) y suero fetal bovino (SFB) (Gibco-Invitrogen) al 10%, previamente inactivado por calor (30 min a 56°C).

Las líneas celulares estables (descritas más adelante) se mantuvieron en las mismas condiciones, excepto cuando se suplementó el medio adicionalmente con el antibiótico de selección relevante. Sin embargo, los experimentos se realizaron con células en DMEM completo sin los agentes de selección, para evitar posibles interferencias causadas por la presencia de los antibióticos.

1.2.2. Congelación celular

Para la congelación de células con el fin de su almacenaje duradero en el tanque de nitrógeno líquido a -180°C, se utilizó medio de congelación compuesto por DMEM completo suplementado con 10% de DMSO (Sigma), excepto en el caso de los MEF, donde se usó suero fetal bovino con un 10% de DMSO.

Todo el material de cultivo fue obtenido de Falcon® (Becton Dickinson), mientras que, si no se especifica, el medio DMEM y los reactivos procedieron de Gibco-Invitrogen.

1.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

1.3.1. HEK-293T-AU1BclX_L-CrmA-p35

Para la producción de retrovirus capaces de expresar moléculas apoptóticas se generó una línea celular que expresa de modo estable los inhibidores de apoptosis Bcl-X_L (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993), CrmA (Ray, Black et al. 1992; Callus y Vaux 2007) y p35 (Clem, Fechheimer et al. 1991). La expresión de estas moléculas hace a las células menos susceptibles a la toxicidad causada por el propio virus, y, por tanto, garantiza títulos de virus comparables. Para la generación de esta línea celular se sembraron 8×10^5 células HEK-293T por pocillo en una placa de 6 pocillos, y se transfectaron al día siguiente mediante el método de la precipitación de fosfato cálcico (ver detalles en "Transfecciones" más adelante) usando 5µg de ADN total linearizado. La mezcla de ADN de transfección constó, por un lado, de 2,5µg de un plásmido bicistrónico que expresa simultáneamente las moléculas AU1Bcl-X_L (una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2) y CrmA (un inhibidor de las caspasas 1, 8 y 10 proveniente del virus de la viruela vacuna) y el gen de resistencia a la higromicina, y, por otro lado, de 2,5µg de un plásmido que codifica el inhibidor viral de caspasas de amplio rango p35 (caspasas 1, 3, 6, 8, 7 y 10), y que, además, contiene el gen de resistencia a puomicina. Tras 24 h en condiciones estándar de cultivo se reemplazó el medio por un medio de selección, DMEM con los antibióticos higromicina (200µg/ml) (Invitrogen), puomicina (0,5µg/ml) (Sigma) y neomicina (0,5mg/ml) (Gibco-Invitrogen), con objeto de garantizar la selección adicional del antígeno T largo presente en la población inicial de las células HEK-293T. Transcurridos unos días, se sembró el cultivo a diluciones altas (en concreto aproximadamente 10, 50 y 100 células/placa de 10cm), en el medio de selección fresco para la obtención de clones. Tras aproximadamente 20 días se recuperaron las colonias resistentes por adherencia a papel Whatman 3MM (Schleicher & Schuell, Alemania) previamente sumergido en tripsina (Gibco-Invitrogen), y se transfirieron las células a placas de 24 pocillos para ser cultivadas hasta llegar a confluencia. Posteriormente, el cultivo de cada clon se creció en una placa de 35mm hasta, finalmente, ser pasado a una placa de 10cm. A continuación se congeló una parte de las células y otra se sometió al análisis para comprobar la funcionalidad de los plásmidos transfectados mediante la transfección de moléculas apoptóticas y la evaluación de la resistencia de los clones a apoptosis. Para ello, se sembraron los clones en placas de 24 pocillos (~140000 células/ pocillo) y se cotransfectaron con diferentes moléculas proapoptóticas (por ejemplo Rip, 700ng de plásmido) en presencia de la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*, 300ng de plásmido), y se analizaron posteriormente en un microscopio de fluorescencia con óptica invertida Zeiss Axiovert 135 para detectar la presencia de células muertas a varios tiempos tras la transfección (24, 36, 48, 60 horas). Finalmente, se escogió un clon que mejor respuesta de viabilidad mostró a los ensayos de sobreexpresión y mejor nivel de expresión de AU1-Bcl-X_L se pudo detectar mediante *western blot* anti-AU1.

1.3.2. MEF-DKO-AU1-Bakcb5

Para caracterizar las vías de señalización transmitidas por Bak exclusivamente localizado en el retículo endoplasmático (RE), se generó una línea celular que expresaba la proteína Bak humana de forma estable y restringida al RE. Para ello, se transdujeron MEF-DKO con retrovirus (ver detalles en “Técnicas retrovirales” más adelante) codificando una versión de Bak humano fusionado a la región transmembrana del citocromo b 5 (AU1-Bakcb5), que le confiere a Bak la capacidad de expresarse exclusivamente en el RE, y el gen de resistencia a la puromicina. Para ello se usó un derivado del plásmido retroviral P12-MMP que contenía la fase de lectura abierta (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) de AU-Bakcb5 y, adicionalmente, el gen de resistencia a puromicina bajo el control de un sitio interno de entrada ribosomal (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*). Tras 24 horas se sustituyó el medio por DMEM suplementado con 1µg/ml de puromicina y se procedió tal y como se describe más arriba para la generación de la línea celular HEK-293T-AU1BclX_L-CrmA-p35. Los clones resistentes a puromicina se analizaron mediante *western blot* para la expresión de la proteína recombinante usando un anticuerpo anti-AU1 (ver tabla 1). Para los estudios posteriores se escogieron dos clones (MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6) en función del nivel de expresión de Bak y de la estabilidad del cultivo en lo que se refiere a la ausencia de muerte celular en condiciones selectivas. Además, se mantuvo la población policlonal inicial (MEF-DKO-AU1-Bakcb5) en medio DMEM suplementado con 1µg/ml de puromicina. Los clones escogidos se cultivaron de la misma manera. Posteriormente, se confirmó la expresión específica de Bakcb5 en el RE mediante técnicas de inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular. El hecho de que las líneas celulares generadas fueran derivadas de células MEF-DKO garantiza el estudio exclusivo de la señalización mediada por Bak reticular, sin interferencias de Bak localizado en otros compartimentos, o de su homólogo Bax.

2. TÉCNICAS DE CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE

2.1. GENERACIÓN DE FRAGMENTOS PLASMÍDICOS

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

Para clonar una secuencia de ADN de interés en un plásmido determinado, se amplificó el fragmento mediante PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos en cuyos extremos se añadieron dianas para las endonucleasas de restricción apropiadas (ver “cebadores usados en las PCR” más adelante). Como ADN molde para la PCR se usaron bien un plásmido preexistente, o bien una genoteca de ADNc proveniente de linfocitos T humanos primarios.

Para la PCR, en primer lugar se linearizó el ADN molde digiriéndolo con una enzima de un único sitio de corte (concentración de ADN 0,5µg/µl), seguido por un paso de inactivación de la correspondiente enzima, habitualmente incubando la mezcla durante 20min a 65°C. A continuación, se partió para cada reacción de PCR de un volumen total de 50µl en agua MilliQ, compuesto por:

- +/- DMSO al 10% (5µl)
- 1x tampón Pfu (5µl de solución de partida al 10%)
- 0,25µl de cada 25mer cebador ($\approx 0,3\mu\text{M}$)
- 0,5µg de ADN molde linearizado
- 0,5µl (=200µM) de los dNTP
- 0,5µl (= 1,5 U) de Pfu polimerasa (Promega).

Las muestras se introdujeron en un termociclador (BioRad) y se sometieron a un protocolo que consistía normalmente en:

- Desnaturalización inicial: 4min a 96°C, seguido de
- Amplificación generalmente con las siguientes fases:
 - Desnaturalización: 1min a 95°C,
 - Anillamiento: 1min a 57- 58°C, y
 - Extensión: 1,0 a 2,5 min a 72°C,
- Seguido de un paso a 4°C hasta sacar las muestras.

El número de ciclos, la temperatura y el tiempo de anillamiento y extensión podían variar ligeramente según el fragmento para amplificar y los cebadores usados.

Los fragmentos así amplificados se comprobaron mediante electroforesis (10µl de un volumen total de 50µl de reacción de PCR) en un gel analítico de agarosa (Pronadisa) al porcentaje adecuado (normalmente del 1,2%), y realizado en tampón TAE 1x (40mM TRIS, 1mM EDTA [pH 8,0]) que contenían, tanto el gel como el tampón, bromuro de etidio (BrEt) a 0,5µg/ml. Para la determinación del tamaño correcto del fragmento, las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron visualizadas en un trasluminador de luz ultravioleta, y sus tamaños fueron comprobados con el marcador de peso molecular de 1kb de Gibco-Invitrogen.

2.1.2. Ligación

Para la ligación, en el caso de PCR, primero se purificaron los fragmentos obtenidos por PCR con el QIAquick® PCR Purification Kit (40µl restantes de la reacción de PCR), según las indicaciones del fabricante, eluyendo en 35µl de tampón TE 1x (TRIS 10mM, EDTA 1mM). A continuación, se digirieron 0,5-1,0µg de ADN (generalmente en 10µl de mezcla de digestión) con 0,2µl (= 2U) de las enzimas de restricción adecuadas (New England Biolabs (NEB) o Promega) normalmente durante al menos 4 horas a 37°C. Posteriormente, se separaron los fragmentos digeridos en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve® GTG® Agarosa) del 1% por electroforesis, y se cortaron los fragmentos visualizados en un trasluminador de luz ultravioleta. Adicionalmente, se recuperaron de la misma manera los ADN digeridos de los vectores correspondientes cuyos extremos 5' habían sido desfosforilados previamente con 0,5µl de fosfatasa alcalina CIP (= 6U por 10µl de mezcla total) (NEB) durante 30 min a 37°C. A continuación se calentaron los fragmentos cortados a 65°C para fundir la agarosa mientras se atemperaron las alícuotas de la mezcla de ligación (por reacción de 10µl: 8,25µl agua MilliQ esterilizada, 0,5µl BSA, 1,25µl 10x tampón de ligación y 0,2µl (=80U) T4 ADN Ligasa (NEB)) a 37°C. Las ligaciones se efectuaron procurando que la relación molar entre inserto y vector de la mezcla de ligación fuese aproximadamente de 2 a 1 (normalmente 2µl a 1µl). Las ligaciones a dos partes (vector e inserto) se incubaron durante al menos 4 horas, mientras aquellas a tres partes (vector y dos insertos de 1,5µl) se realizaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Se prepararon también ligaciones control con sólo vector o conjuntamente con uno de los insertos en el caso de las ligaciones a tres partes. En el caso de que el fragmento no proviniera de PCR sino de la digestión de un plásmido existente, se han seguido esencialmente los mismos pasos para cortar, purificar y ligar los fragmentos deseados.

2.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Una vez terminadas, las ligaciones fueron usadas generalmente para transformar células competentes por choque térmico. Normalmente se usó la cepa DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*), elaborada por la Unidad de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer (Inoue, Nojima et al. 1990). En el caso de transformaciones con un plásmido *supF*, se utilizó la cepa MC1061/P3 *E.coli* de (Invitrogen). Brevemente, se mezclaron 2,4µl de ligación con 50µl de bacterias competentes para su incubación durante 30min a 4°C (en caso de ligaciones a tres partes se usó el doble de estos volúmenes, mientras que, en caso de recrecer un plásmido, se usaron 30µl de bacterias y aproximadamente 1µg de ADN plasmídico). Seguidamente se incubaron las bacterias a 42°C durante 45 segundos, tras lo cual se sembraron en placas de medio rico LB (Luria Bertani: 0,5% extracto de levadura, 1,0% triptona, 1,0% NaCl) con el antibiótico apropiado para la selección del plásmido deseado, habitualmente ampicilina a 100µg/ml en placas LB-agar; pero para la cepa *E.coli* MC1061/P3, 7,5µg/ml tetraciclina y 12,5µg/ml

ampicilina, a la cual se había añadido anteriormente una capa fina de medio LB de 1,5% LB-agar. Finalmente, se incubaron las placas boca abajo toda la noche a 37°C hasta analizarlas al día siguiente.

2.3. CULTIVO BACTERIANO Y EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

2.3.1. Precultivo líquido

El día siguiente a la transformación se escogieron algunas de las colonias obtenidas y se hicieron precultivos líquidos (en 5ml de LB con ampicilina a 50µg/ml o 7,5µg/ml tetraciclina y 12,5µg/ml ampicilina en el caso de la cepa *E.coli* MC1061/P3). Tras 16-20 horas de crecimiento a 37°C en agitación, los cultivos bacterianos se usaron para la minipreparación de ADN plasmídico, bien mediante el método de purificación de ADN por calor, o bien por el *QIAprep® Spin Miniprep Kit*.

2.3.2. Minipreparación de ADN plasmídico por calor

En el caso de digestiones diagnósticas para inocular un cultivo líquido de mayor volumen, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico con el método de purificación de ADN por calor. En este caso se partió de un cultivo bacteriano de 1,5ml. Se sedimentaron las bacterias por centrifugación y se lisaron las bacterias mediante la adición de 400µl tampón STET (8% (v/v) sacarosa, 5% (v/v) triton X-100, 50mM EDTA, 50mM TRIS [pH 8.0]) y lisozima a una concentración final de 0,7µg/µl (5,6µl de solución de partida a 50mg/ml), y se trataron posteriormente a 100°C durante 3min. Subsiguientemente se centrifugaron los restos bacterianos durante 15min a 4°C y 16100xg, y se eliminó el sedimento con un palillo estéril. Para precipitar el ADN plasmídico se añadió isopropanol al 100% 1:1 al sobrenadante. Se mezclaron y se sometieron las muestras a una centrifugación de 16100xg a 4°C durante 15min. Se aspiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de ADN con 500µl de etanol frío al 70%, seguido de una centrifugación de 5min. El etanol fue aspirado y el precipitado de ADN secado y después resuspendido en 50µl tampón TE suplementado con RNAsa A a una concentración final de 0,2µg/µl (0,5µl de solución de partida a 20mg/ml).

2.3.3. Minipreparación de ADN plasmídico por el *QIAprep® Spin Miniprep Kit*

Para la secuenciación o la transfección de células en cultivo, se usó el método de *QIAprep® Spin Miniprep Kit* para purificar el ADN plasmídico. Normalmente se partió de un cultivo bacteriano de 3ml y, posteriormente, se siguieron las instrucciones del fabricante, excepto en el caso en el que el precipitado obtenido del ADN plasmídico fuese finalmente eluido en 35µl del tampón TE.

2.3.4. Digestión del ADN plasmídico obtenido mediante enzimas de restricción

El ADN plasmídico purificado se analizó posteriormente mediante digestiones con enzimas de restricción y electroforesis en un gel de agarosa analítico. Para ello, se utilizaron 1-2 µl de ADN plasmídico

en un volumen total de 10µl en tampón TE, utilizando 2U (0,2µl) de las enzimas de restricción correspondientes.

2.3.5. Secuenciación

En el caso de que algunos de los elementos de la construcción requirieran confirmación más fina, los clones positivos por digestión se sometieron a secuenciación. Para ello, se mezclaron 500ng de ADN plasmídico con 3pmoles de los oligonucleótidos correspondientes en 8µl agua MilliQ mediante el *3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Hitachi, Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca). Para el análisis de las secuencias se usaron los programas *Sequencing Analysis 3.7*, *Edit Seq* y *Edit View*, mientras que los programas de alineamiento de secuencias y generación de mapas fueron *MegAlign* y *MapDraw* (DNASTar).

2.3.6. Crecimiento bacteriano para maxipreparaciones

Cuando se querían extraer cantidades mayores de ADN plasmídico se volvió a inocular medio LB (de 60 a 400ml) con el precultivo de las bacterias en cuestión. Tras otras 16-20 horas de incubación en agitación a 37°C se extrajo el ADN mediante métodos de purificación del *Qiagen® Plasmid Midi* o *Maxi Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: Para purificaciones tipo Midi se inocularon 60ml LB líquido, mientras que para preparaciones tipo Maxi se usaron 200ml para plásmidos de alto número de copias y 400ml para plásmidos de bajo número de copias. El ADN obtenido de tipo Midi fue resuspendido en 60µl y el de tipo Maxi, en 400µl tampón TE.

2.4. PLÁSMIDOS

Para las construcciones de ADNc se han usado dos sistemas de expresión:

- **La serie de plásmidos de expresión pEAK (P8 y P12)** (Edge Biosystems) que expresa los insertos bajo el promotor del gen EF1α y contiene genes de resistencia tanto para puromicina como para ampicilina.
- **El vector retroviral P12-MMP.** Este vector es un derivado del vector pMMP (del Dr. Richard Mulligan) cedido amablemente por el Dr. Felix Randow. El ADNc se clonó entre las regiones LTR (repeticiones terminales largas, del inglés *long terminal repeats*) del vector que actúan como secuencias promotoras. Para las infecciones retrovirales, se utilizaron además los plásmidos pMD-gag-pol (que expresa proteínas necesarias para la encapsidación viral y la transcriptasa reversa) y pMD-G (que expresa la proteína G de la envoltura del virus), obtenidos también del Dr. Richard Mulligan (Riviere, Brose et al. 1995).

Los ADNc utilizados en estos estudios han sido de procedencia humana y contienen la misma secuencia consenso de iniciación de traducción (*Kozak*, gccaccatg). Los ADNc no etiquetados fueron clonados

normalmente utilizando en 5' un sitio HindIII y en 3' un sitio NotI, ambos introducidos en el cebador, mientras que para las versiones etiquetadas se clonaron entre los sitios Pci y NotI, estando la etiqueta relevante clonada en la zona 5' entre los sitios HindIII y PciI. Las etiquetas usadas fueron GFP o bien los epítotos AU1 (DTYRYI, derivado de la proteína grande de la cápsida del virus de papiloma bovino-1 (BPV-1)) o el de la hemaglutinina HA1 (YPYDVPDYA, del virus de la influenza equina). En general no se observaron diferencias en el comportamiento de una proteína en versión etiquetada con respecto a su equivalente no etiquetada.

- *P8-(AU)-Bak, P8-(AU)-Bax, P12-Bim_{EL}, P12-tBid, P12-MMP-AU/HA-Bim_{EL}, P12-MMP-AU/HA-tBid*

Los ADNc de Bak, Bim_{EL} y tBid fueron amplificados mediante PCR utilizando cebadores adecuados (ver "cebadores usados en las PCR" más adelante). El ADNc de Bax se clonó de un *screening* de una librería de ADNc proveniente de células T humanas activadas que se había diseñado en el laboratorio para la identificación de moléculas inductoras de muerte celular (Alcala, Klee et al. 2007). Posteriormente se clonaron los fragmentos en los plásmidos de expresión pEAK o P12-MMP utilizando los sitios de clonaje HindIII y NotI. En P12-Bim/P12-tBid y P8-AU-Bak el sitio NcoI de la secuencia Kozak quedaba disponible, mientras que en los plásmidos P8-Bak, P12-MMP-AU/HA-Bim_{EL}/tBid y P8-AU-Bax los sitios PciI y NcoI se eliminaron mutuamente en el N-terminal del ADNc (aguas abajo de AU/HA).

- *P8-AU/GFP-Bakcb5 y P12-MMP-AU-Bakcb5-IRES-Puro*

Para amplificar por PCR una versión de Bak carente de la región transmembrana (aa 187-211) en las construcciones de Bak(Δ TM)cb5, se usó como molde la construcción de Bak descrita más arriba,. Esta secuencia transmembrana fue sustituida por la señal de localización reticular cb5 (que consistía en la región transmembrana del citocromo b 5, y que fue originalmente cedida por el Dr. Craig Thompson (Zong, Li et al. 2003)). Para ello se insertó el cb5 aguas abajo del aminoácido 186 (G), usando un sitio BbsI introducido en el cebador. Posteriormente, Bakcb5 fue clonado en los vectores pEAK o P12-MMP. En el caso del vector retroviral el ADNc fue introducido junto a un gen de resistencia a puromicina que estaba bajo el control de un sitio interno de entrada ribosomal (IRES).

- *P8-(AU)-Bak- Δ BH3*

Bak- Δ BH3 fue generado mediante PCR. En este caso se sustituyó el dominio BH3 (los aminoácidos 72 al 88, ambos eliminados) por un sitio EcoR1 que introdujo los aminoácidos EF en su lugar.

- *P8-(AU/GFP)-Bak- Δ BH3cb5/ActA*

Se usó PCR para generar tanto las construcciones Bak- Δ BH3-cb5 como Bak- Δ BH3-ActA en las que la región transmembrana de Bak fue sustituida por la señal de localización reticular cb5 (Zong, Li et al. 2003) o por aquella de localización mitocondrial ActA. ActA es la secuencia de localización mitocondrial de la

proteína de superficie ActA proveniente de la bacteria *Listeria monocytogenes*. Su localización exclusiva en la mitocondria ha sido demostrada previamente (Pistor, Chakraborty et al. 1994; Zhu, Cowie et al. 1996). Las secuencias de localización fueron insertadas aguas abajo del aminoácido 186 (en la molécula entera) de Bak- Δ BH3, usando un sitio Bbs1 introducido en el cebador. Los ADN molde que contenían Bakcb5 murino y Bcl2-ActA fueron amablemente cedidos por el Dr. Craig Thompson (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) y el Dr. David Andrews (McMaster University, Hamilton, Canadá), respectivamente.

- *P8-(AU)-Bak- Δ BH3 Δ BH1*

Bak- Δ BH3 Δ BH1 se ha generado por PCR sustituyendo el dominio BH1 (aminoácidos 117 al 136) por un sitio BamH1 en fase (aminoácidos GS).

- *P12-MMP-HA-Bim_{EL}- Δ TM-cb5/ActA y P8-GFP-Bim_{EL}- Δ TM-cb5/ActA*

Para generar las construcciones reticulares (cb5) y mitocondriales (ActA) de Bim_{EL} se eliminó una secuencia hidrofóbica en el C-terminal que constituye una región transmembrana potencial, y por tanto podría ser importante en su localización subcelular (aminoácidos 181-198) (Yamaguchi y Wang 2002). En su lugar se introdujo la secuencia relevante cb5 o ActA, ambas cedidas amablemente por el Dr. Craig Thompson (Zong, Li et al. 2003). Las construcciones Bim_{EL} Δ TMActA/cb5 mostraron más especificidad subcelular que la proteína Bim_{EL} entera a cuyo C-terminal se habían añadido las secuencias cb5 o ActA (Bim_{EL}ActA o Bim_{EL}cb5).

- *P12-MMP-AU/HA-Puma*

El ADNc que codifica Puma se obtuvo del Dr. Bert Vogelstein (Yu, Zhang et al. 2001), y fue clonado HindIII a NotI en el vector P12-MMP, preservando el sitio PciI, que fue utilizado posteriormente para generar versiones etiquetadas (AU/HA) del ADNc.

- *P12-MMP-HA-Pumacb5/ActA y P8-GFP-Pumacb5/ActA*

Los plásmidos de Puma-cb5 y Puma-ActA fueron generados mediante adición de los péptidos al C-terminal del ADNc completo. Tanto ActA como cb5 (cedidos por el Dr. Craig Thompson, ver arriba) fueron insertados aguas abajo del producto de PCR relevante, utilizando un sitio BamH1 en fase (DP).

- *P12-MMP-HA-TRAF2-DN*

El dominante negativo (DN) de TRAF2 (TRAF2-DN) codifica una versión truncada de TRAF2 que carece de los primeros 86 aminoácidos. Su actividad como regulador dominante negativo en la vía de señalización iniciada por IRE1 en respuesta a estrés reticular ha sido mostrado previamente (Urano, Wang et al. 2000).

- *P8-Bcl-X_L*

Para la construcción no etiquetada de Bcl-X_L se partió del plásmido EF1 α -pac-EBV-AU-BclX_L (Pimentel-Muinos y Seed 1999), que se digirió con las enzimas PciI y NotI para liberar el ADNc de Bcl-X_L y clonarlo posteriormente en el vector pEAK digerido con NcoI/NotI. Esta ligación anuló los sitios de restricción de NcoI/PciI aguas arriba de Bcl-X_L, mientras que se conservó el sitio NotI aguas abajo.

- *pcDNA3-Casp9DN y pcDNA3-p35*

Los plásmidos de expresión del dominante negativo de caspasa 9 (C9.DN) y el plásmido que contenía p35 fueron obtenidos del Dr. S. Rabizadeh (The Buck Institute for Age Research, Novato, CA, (Rabizadeh, Xavier et al. 2004).

- *P12-p35*

Esta construcción se ha generado a partir del pcDNA3-p35 digerido con la enzima EcoRI y clonado de EcoRI a EcoRI en el vector pEAK que contiene un gen de resistencia a puomicina. Posteriormente se verificó mediante secuenciación que el ADNc se había clonado en el sentido correcto.

- *P12-mRFP y P12-mGFP*

Las GFP/RFP mitocondriales (mGFP/mRFP) fueron generadas mediante fusión de la secuencia de localización mitocondrial de la ornitina transcarbamilasa (LF-OTC-flag, proporcionado por la Dr. Ute Moll, (Marchenko, Zaika et al. 2000)) en el N-terminal de GFP o RFP (Alcala, Klee et al. 2007).

- *P12-reRFP y P12-reGFP*

La RFP reticular (reRFP) fue generada por PCR para insertar la secuencia de los aminoácidos SEKDEL en el C-terminal de la RFP. SEKDEL confiere la capacidad de retención de la proteína en el RE (Munro y Pelham 1987). Posteriormente este fragmento fue ligado aguas abajo de la secuencia líder de la molécula de superficie CD5 en el vector pEAK. La reGFP fue generada a partir de esta construcción por simple sustitución de la secuencia codificante de RFP por GFP.

- *P12-reYC3.3*

YC3.3 ha sido proporcionado por el Dr. R. Tsien (University of California, San Diego, La Jolla, CA) (Miyawaki, Llopis et al. 1997). Para construir la versión reticular del indicador de calcio (reYC3.3) se utilizó una estrategia parecida a la del diseño de la reRFP.

Plásmidos *supF*

Los plásmidos *supF* contienen una secuencia que codifica un supresor del ARNt de tirosina (gen sintético *supF*). Este plásmido requiere el uso de las bacterias competentes Ultracomp™ *E.coli* MC1061/P3 (Invitrogen) que contienen el plásmido P3. Aunque este plásmido P3 lleve genes de resistencia a kanamicina, ampicilina y tetraciclina, solamente el de kanamicina está intacto, y por tanto sirve para seleccionar las bacterias, mientras que los genes para tetraciclina y ampicilina llevan ambas mutaciones en forma de codones stop que causan su inactividad. Tras la transformación con un vector que lleva el gen *supF* que codifica un ARNt sintetizado capaz de leer a través de los codones stop, las mutaciones en ambos genes son suprimidas y las bacterias recuperan la resistencia para estos antibióticos. La selección de un cultivo de *E.coli* MC1061/P3 se hizo en placas de LB con 7,5µg/ml tetraciclina y 12,5µg/ml ampicilina.

- *pCDNA-BclX_L-CrmA-Hygro (supF)*

Este es un plásmido bicistrónico *supF*, en el que los genes Bcl-X_L y CrmA están bajo el control de un promotor EF1α cada uno. Adicionalmente, el plásmido expresa el gen de resistencia a higromicina.

- *EF1α-pac-EBV-AU-BclX_L (supF)*

La construcción de Bcl-X_L fue descrita por Pimentel-Muñoz y Seed (Pimentel-Muñoz y Seed 1999).

Cebadores usados en las PCR:**Bak:**

Pci-Bak-sentido: gggccc acatgt ccggcgc ATGGCTTCGGGGCAAGGCCAGGT

Not-STOP-Bak-antisentido: cccggg gcggccgc tttt TGATTTGAAGAATCTTCGTACCAC

Bak(ΔTM)cb5:

Bak-ΔTM-Bbs-antisentido: cccggg gaagac gc tcag ACCATTGCCCAAGTTCAGGGCTGCC

cb5-TM-Bbs-sentido: gggccc gaagac gc atcaccaccgtggagtccaactct

cb5-TM-Not-STOP-antisentido: cccggg gcggccgc tttt gtctcgccatgtacaggcggtag

BakΔBH3:

Bak-Eco-ΔBH3-antisentido: cccggg gaattc CATGGTCTGCTAGGTTGCAGA

Bak-Eco-ΔBH3-sentido: gggccc gaattc TATGACTCAGAGTTCAGACCA

BakΔBH3ΔBH1:

Bak-ΔBH1-BamH1-antisentido: cccggg ggatcc GGTGGCAATCTTGGTGAAGTAC

Bak-ΔBH1-BamH1-sentido: gggccc ggatcc CGTCTGGCCCTACACGTCTACC

Bim_{EL}:

HindIII-Kozak-NcoI-Bim_{EL}-sentido: gggccc aagctt gccaccatg GCAAAGCAACCTTCTGATG

Not-STOP-Bim_{EL}-antisentido: cccggg gcggccgc tttt ATGCATTCTCCACACCAGGCGG

Bim_{EL}-ΔTM-BamH1-GG-antisentido: cccggg ggg atc ccc gcc TCGTGGGTGGTCTTCGGCTGCTTGGT

tBid:

HindIII-Kozak-NcoI-tBid-sentido: gggccc aagctt gccacatg GGCAACCGCAGCAGCCACTCCC

Not-STOP-tBid-antisentido: cccggg gcgggccgc tttta GTCCATCCCATTTCTGGCTAAG

Puma:

Puma-Pci-sentido: gggccc acatgt ccggc ATGGCCCGCGCAGCCAGGAGGGC

Puma-Not-STOP-antisentido: cccggg gcgggccgc tttta ATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTC

Puma-BamH1-GG-antisentido: cccggg ggg atc ccc gcc ATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTCTGTG

Nota: las letras en minúsculas representan los aminoácidos que no aparean (gggccc: espaciador, gccacatgg: secuencia *Kozak*); las letras en mayúsculas representan los aminoácidos que aparean con el ADNc.

3. TÉCNICAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EN CULTIVO

3.1. TRANSFECCIONES

Los ADNc de interés se transfectaron en células HEK-293T mediante el método de precipitación con fosfato cálcico, mientras que las células Cos-7, HeLa y células MEF se transfectaron con el reactivo lipídico FuGENE®6 (Roche).

3.1.1. Método de precipitación con fosfato cálcico

Las células HEK-293T se sembraron 17 a 24 horas antes de la transfección en las cantidades siguientes: $1,4 \times 10^5$ células por pocillo de una placa de 24 pocillos, 9×10^5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos, ó 4×10^6 por placa de 10cm. Al día siguiente, entre 1 y 4 horas antes de la transfección, se cambió el medio por medio fresco. La mezcla de transfección se hizo en tubos de 1,5ml en los que se pusieron, por orden (para placas de 6 pocillos), 112,5µl H₂O MilliQ, 12,5µl CaCl₂ (2,5M *tissue culture grade* (Sigma) en agua) y 5µg total de mezcla de ADN. A esta solución se añadió 250µl del tampón 2x HeBS, pH 7,1 (280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 11 mM glucosa y 50 mM HEPES) y se mezcló aproximadamente 10 veces con la pipeta hasta generar un precipitado ADN-fosfato cálcico que inmediatamente después fue añadido gota a gota sobre las células. Para transfecciones en placas de 24 pocillos o de placas de 10cm se usaron volúmenes de reactivos proporcionales a la superficie de las placas (para placas de 24 pocillos 1/5, y para placas de 10cm 5 veces los volúmenes descritos). La homogeneidad del precipitado entre varios pocillos fue comprobada en un microscopio de cultivo celular (Zeiss Axiovert 25) unos minutos después de haberlo añadido a las células. La eficiencia de transfección se pudo calcular en células control transfectadas con un vector de expresión que codifica la proteína GFP, y osciló siempre entre un 30 y 60% de la totalidad de células.

3.1.2. Uso del reactivo lipídico FuGENE®6

Las células Cos-7, HeLa y MEF que no son transfectables eficientemente por el método de fosfato cálcico, se transfectaron con el reactivo lipídico FuGENE®6 (Roche). Para ello, se sembraron las células en placas de 24 pocillos y DMEM completo en densidades adecuadas (~ 60000 células/ pocillo) el día anterior, y 24 horas después, se siguieron básicamente las instrucciones del fabricante. Resumidamente, para cada pocillo se usaron 0,4µg de ADN total preincubado con una mezcla de 40µl de DMEM (en ausencia de suero y antibióticos, pero con L-glutamina) que contenía 1,2µl del reactivo FuGENE®6. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente hasta añadirlo gota a gota sobre las células.

3.2. TÉCNICAS RETROVIRALES

3.2.1. Producción de retrovirus

Para la producción de retrovirus se usaron células productoras HEK-293T silvestres, excepto en el caso de producción de virus que codificaban proteínas proapoptóticas donde se usaron las células HEK-293T-AU1Bcl_{XL}-CrmA-p35 (ver "Generación de líneas celulares estables"). Para ello, se sembraron las células en placas de 6 pocillos y, al día siguiente, se les cambió por medio fresco entre 1 y 4 horas antes de transfectarlas. Una vez transcurrido este tiempo, se preparó una mezcla de transfección compuesta por 5µg de ADN total, siendo 2,5µg del ADNc de interés clonado en el vector retroviral pEAK12-MMP ((Alcala, Klee et al. 2007), ver "Plásmidos") y 0,7µg de pMD-VSV-G (del inglés *vesicular stomatitis virus G protein*) que codifica la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular, y 1,9µg de pMD-MLV-OGP que codifica gag-pol (gag: proteínas estructurales, pol: retrotranscriptasa). A las 24 horas de la transfección se sustituyeron los 4ml del medio por la mitad de volumen (habitualmente de 2 a 2,5 ml) de medio fresco con el fin de incrementar la concentración del virus.

3.2.2. Infección de células diana

A las 48 y 72 horas de la transfección los sobrenadantes virales de las células productoras fueron recogidos y centrifugados durante 5min a 400xg o filtrados por jeringas de 0,22µm de grosor de poro (MilliPore) para descartar una contaminación del virus con células productoras. Al sobrenadante así purificado se le añadió un volumen igual de DMEM y, opcionalmente, polibreno (Pb, Sigma) a una concentración final de 8µg/ml para mejorar la eficiencia de infección. El Pb es una molécula pequeña de carga positiva que favorece la aposición de la membrana celular y la cubierta lipídica del virus. Una vez mezclado con suavidad se reemplazó el DMEM de las células por 3ml de mezcla DMEM-sobrenadante viral por pocillo de una placa de 6 pocillos y se centrifugaron a 32°C y 650xg durante 1 hora.

Para comprobar la eficiencia de la infección de las células diana se produjo en paralelo un retrovirus de GFP que posteriormente fue usado para la infección de células diana control. A partir de las 17 horas tras la infección, se evaluó el porcentaje (habitualmente entre 90-100%) de células que expresaban el marcador fluorescente por microscopía de fluorescencia con óptica invertida (Zeiss Axiovert 135).

4. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

4.1. INMUNOFLUORESCENCIA

Para llevar a cabo los marcajes fluorescentes de proteínas celulares tanto endógenas como sobreexpresadas, se crecieron las células bien sobre cubreobjetos pretratados para su uso en cultivo celular *Microscope Cover Glass* (Fisher Scientific) (MEF, HeLa, Cos-7) o, en caso de células HEK-293T, sobre cubreobjetos de 10mm (Menzel-Gläser) anteriormente recubiertos de poli-L-lisina mediante incubación con una solución del 0,01% (Sigma) durante 20min, y colocados en placas de 24 pocillos. Después de 16-24 horas de adhesión, las células fueron procesadas según los requerimientos del experimento. El día del marcaje se lavaron las células dos veces con PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 4% (en PBS 1x recién preparado), durante 15min a temperatura ambiente. A continuación, se volvieron a lavar las células con PBS. En el caso de células poco adherentes o células apoptóticas fácilmente despegables (MEF-DKO-AU1-Bakcb5 por ejemplo) se evitó el lavado excesivo o se fijaron las células directamente con paraformaldehído sin lavar previamente. A continuación se permeabilizaron las membranas celulares con NP-40 y se bloquearon los grupos aldehído libres mediante glicina, sumergiendo los cubreobjetos a temperatura ambiente en solución de permeabilización (100mM glicina/0,5% NP40 en PBS 1x) durante 30 minutos. Para teñir los núcleos se incubaron las células permeabilizadas durante 5min con 0,5ml DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, del inglés 4',6' *Diamidino-2-phenylindole*) (1µg/ml en PBS) en oscuridad, tras lo cual se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS y se bloquearon entre 30 minutos y 1 hora en 3% BSA en PBS 1x con 0,1% azida. Tras dos pasos de lavados con PBS los cubreobjetos fueron incubados con los correspondientes anticuerpos primarios (diluidos a la concentración adecuada en PBS con 2% BSA y 0,1% azida; ver tabla 1) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos secundarios pertinentes diluidos en PBS al 2% BSA y 0,1% de azida (ver tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se lavaron dos veces con PBS y se montaron en portaobjetos usando Mowiol 4-88 (Calbiochem) (Harlow y Lane, 1988). Al cabo de al menos 2 horas se sellaron los cubreobjetos con laca de uñas y se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 2 o Zeiss AxioPlan 2 con módulo confocal LSM-510.

4.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONTAJES CÉLULARES

4.2.1. Cuantificación de células vacuolizadas

Para la cuantificación de células que mostraban la vacuolización citoplasmática se plaquearon HEK-293T, MEF o HeLa sobre cubreobjetos y, al día siguiente, se cotransfectaron las células con los plásmidos deseados junto con el marcador citosólico GFP. A los tiempos indicados, las células fueron fijadas, montadas y sometidas a conteo en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2, utilizando habitualmente el objetivo 20x. Se contaron de varios campos del cubreobjeto un total de entre 400 y 600 células positivas para GFP, entre las cuales se cuantificó el porcentaje que mostraban una vacuolización citoplasmática detectable por la exclusión del marcador.

4.2.2. Cuantificación de células con citocromo c liberado al citoplasma

Para la evaluación de la salida de citocromo c de la mitocondria se usaron células crecidas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos y transducidas en presencia del inhibidor comercial de caspasas z-VAD-fmk (BD Pharmingen). Las inmuno-fluorescencias se realizaron incubando con un anticuerpo anti-citocromo c y un anticuerpo secundario conjugado a CY3 para detectar la proteína mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioplan 2). El conteo se efectuó como se ha descrito (ver "Cuantificación de células vacuolizadas"), con la excepción de que se contaron al menos 600 células con marcaje de citocromo c y se determinó el porcentaje de aquellas células que mostraron una distribución de citocromo c mayoritaria o enteramente difusa, frente a aquellas con una distribución claramente mitocondrial.

4.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

Los estudios de microscopía confocal se realizaron en un microscopio Zeiss Axiovert 200M equipado con el módulo confocal LSM-510, y con láseres de argón (cuya banda de 488nm se utilizó para excitar GFP y el fluorocromo Alexa 488) y helio-neón (cuya banda de 543nm fue usada para excitar RFP y el fluorocromo Cy3). En los casos en que se visualizaron más de un fluorocromo en la misma muestra, ambos fueron excitados secuencialmente (no simultáneamente) para evitar interferencias entre canales. Todas las muestras fueron captadas habitualmente con los objetivos 63x o 100x, en estado fijado, salvo aquellas en las que se evaluó la expresión de reRFP (RFP reticular) en vacuolas citoplasmáticas. La captura de estas muestras se hizo con células *in vivo* dado que el marcaje de vacuolas con reRFP resultó ser sensible a la fijación, lo que conllevaba su total desaparición. Para la observación *in vivo*, se sembraron las células sobre cubreobjetos que se transfirieron el día del análisis a una placa de fondo de cristal apta para su uso en microscopía (WillCo). El programa de captura que se utilizó fue en todos los casos el LSM-510 de Zeiss y los de manipulación de fotos el LSM Image Browser y Adobe Photoshop.

5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.1. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

5.1.1. Obtención y preparación de extractos proteicos

Para la lisis de células muy adherentes, como MEF, HeLa y Cos-7, se despegaron las células de las placas mediante tripsinización. Otras células menos adherentes, como las HEK-293T, se despegaron simplemente por pipeteo. Seguidamente se centrifugaron durante 5min a 400xg y 4°C, o durante 10min a 650xg, en caso de querer sedimentar también células apoptóticas. Tras un lavado con DMEM frío en caso de haberlas tripsinizado, y otro adicional con PBS frío, se succionó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en un tampón de lisis NP-40 compuesto de 50mM TRIS [pH 7,5], 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% (v/v) de NP-40 (Sigma) y, además, de aprotinina y leupeptina (Roche) a 10µg/ml y 1mM PMSF (del inglés *phenylmethyl sulphonyl fluoride*), añadido justo antes de ser usado. Transcurridos 30min de incubación en hielo, los lisados se centrifugaron durante 5 min a 16000xg y 4°C. De los sobrenadantes resultantes se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (BioRad). El Bradford es un método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250, cuya absorbancia cambia de 465nm a 595nm tras la unión a proteínas. La concentración de proteína se calculó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas a 595nm en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas (de 0 a 20µg) de BSA (NEB).

5.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para separar las proteínas en función de su tamaño se analizaron las muestras proteicas por electroforesis en geles de poliacrilamida (Pronadisa) en presencia de SDS (SDS-PAGE, (Laemmli 1970)). Entre 20 y 40µg de los extractos proteicos se desnaturalizaron durante 10min a 100°C en tampón de carga (2x compuesto de 100mM TRIS [pH 6,8], 10% β-mercaptoetanol o 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol y 20% de glicerol en agua). Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en un tampón de carrera que contiene TRIS (25mM), glicina (200mM) y SDS (0,05%), a voltaje constante de 100 voltios, utilizando el sistema *Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell* (Bio Rad). Como marcador de peso molecular se usaron marcadores preteñidos, bien el *Amersham Rainbow™ Coloured Protein Molecular Weight Marker* (RPN756, GE Healthcare, UK), o bien el marcador de rango amplio de BioRad (#161-0318).

5.1.3. Transferencia de proteínas e inmunodetección (*western blot*)

Las proteínas presentes en el gel se electrotransferieron a una membrana PVDF (Immobilon™, Millipore IPVH00010) utilizando el sistema *Mini Trans-blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) en tampón de transferencia (1x: 25mM TRIS, 192mM glicina, metanol al 20%) a 90 voltios y 4°C durante 2 horas. En algunos casos se comprobó la presencia de igual carga y eficiencia de transferencia mediante

tinción con *Ponceau*. Para este fin, se tiñeron las membranas con una solución de tinción al 0,1% en 0,5% ácido acético (Sigma) durante 5-15min; se lavaron seguidamente con agua MilliQ, y finalmente se destiñeron con TBS al 0,05% de Tween 20 (TBS-T).

Las membranas se bloquearon posteriormente en agitación con 10% de leche desnatada en polvo (Sveltesse, Nestle) disuelta en TBS-T (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados de 5 minutos se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios diluidos en un tampón de 2% BSA (Sigma) y 0,1% azida sódica en TBS-T (1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C). Las diluciones utilizadas para los diferentes anticuerpos se muestran en la tabla 1. El exceso de anticuerpo se eliminó con cinco lavados de 10 minutos con TBS-T, y posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*) durante 1 hora a temperatura ambiente, normalmente diluidos 1:5000 en TBS-T conteniendo además un 1-5% de leche desnatada en polvo (ver tabla 2). Tras otros cinco lavados de 10 minutos con TBS-T, se detectaron las proteínas por quimioluminiscencia usando el kit *ECL™* o *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare, Reino Unido) y las películas *superRX* (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm, Japón) o *Hyperfilm™ECL* (Amersham Biosciences, Reino Unido).

Después del revelado, se lavaron las membranas brevemente en TBS-T para su posterior almacenamiento a -20°C. En caso de que se pretendiera rehibridar las membranas con otro anticuerpo primario, se incubaron en guanidina 7N (Sigma) durante 20min seguido de tres lavados de 5min y del bloqueo con leche para seguir el mismo proceso anteriormente descrito.

5.1.4. Anticuerpos

Anticuerpo	Especie	Especificidad (Nº clon)	Casa comercial	Dilución / Concentración de uso	Peso molecular reconocido	Nº Catálogo
α -Actina	ratón	monoclonal (AC-40)	SIGMA	1:1000 (W)	42 kDa	A4700
α -AU1	ratón	monoclonal (AU1)	Covance	1:1000 (W), 1:500 (IF)	etiqueta	MMS-130P
α -Bak	conejo	policlonal	BD Pharmingen	1,5µl/ml (W)	24 kDa	556396
α -Bax (N-20)	conejo	policlonal	Santa Cruz	1:300 (W)	23 kDa	sc-493
α -Calnexina	ratón	monoclonal	BD Pharmingen	1:750 (W)	90 kDa	C45520-050
α -Calnexina	conejo	policlonal	Stressgen	1/100000 (W), 1/400 (IF)	90 kDa	SPA-860
α -Calreticulina (405-417)	conejo	policlonal	Calbiochem	1:100 (IF)	Uso único en IF	208910
α -Caspasa 3 (Asp175)	conejo	policlonal	Cell Signaling	1:1000 (W)	17/19 kDa (tr)	#9661
α -Caspasa 9	ratón	monoclonal	Cell Signaling	1:1000 (W)	51 kDa , 39/37 kDa (tr)	#9508
α -Caspasa 12	conejo	policlonal	Cell Signaling	1:1000 (W)	55 kDa. 42 kDa (tr)	#2202
α -Citocromo c	ratón	monoclonal (6H2.B4)	BD Pharmingen	1:200 (IF)	Uso único en IF	556432
α -HA.11	ratón	monoclonal (16B12)	Covance	1:1000 (W), 1:500 (IF)	etiqueta	MMS-101P
α -PARP	ratón	monoclonal (C2-10)	BD Pharmingen	1:2000 (W)	116 kDa; 85 kDa (tr)	556362
α -VDAC(Porin) (Ab-5)	conejo	policlonal	Calbiochem	1:1000 (W)	31 kDa	PC548T
α -VDAC 31HL (Porin) (Ab-2)	ratón	monoclonal	Calbiochem	1:1000 (W)	31 kDa	529534
α -TRAF2 (C-20)	conejo	policlonal	Santa Cruz	1:1000 (W)	50 kDa	sc-876
α -IRE1 α (14C10)	conejo	policlonal	Cell Signaling	1:1000 (W)	130 kDa	#3294

Tabla 1: Anticuerpos primarios.

Antígeno	Especie	Conjugado a	Casa Comercial	Dilución	Nº Catálogo
IgG de conejo	cabra	HRP	DakoCytomation	1:5000 (W)	P 0448
IgG de conejo	burro	HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000 (W)	711-035-152
IgG de ratón	cabra	HRP	DakoCytomation	1:5000 (W)	P 0447
IgG de conejo	cabra	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:400 (IF)	111-165-003
IgG de ratón	cabra	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:200 (IF)	115-165-003
IgG de conejo	cabra	Alexa-Fluor 488	Invitrogen	1:400 (IF)	A-11070
IgG de ratón	conejo	Alexa-Fluor 488	Invitrogen	1:400 (IF)	A-11059

Nota: "W" es la abreviación para el uso en *western blot*; "IF", para el uso en Inmunofluorescencia; "tr", el fragmento truncado.

Tabla 2: Anticuerpos secundarios.

5.2. MÉTODOS DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Los fraccionamientos subcelulares fueron llevados a cabo para comprobar bioquímicamente la localización subcelular de Bakcb5 en los clones MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6.

5.2.1. Purificación de mitocondrias

Para el aislamiento de mitocondrias intactas frente a componentes citosólicos (incluyendo RE) de células MEF DKO y MEF-DKO que expresan establemente AU1-Bakcb5, se sembraron 5×10^6 células por placa de 10cm, utilizando en total cuatro placas. Al día siguiente se recogieron las células mediante tripsinización, siendo el sedimento celular de dos placas el material de partida para cada purificación (habiendo además duplicados por cada tipo celular que al final de la purificación se unificaron para obtener una mayor cantidad de proteína) y se lavaron 1 ó 2 veces con PBS 1x. A continuación se siguieron las instrucciones del *Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells* de Pierce (89874). La única modificación significativa de este protocolo consistía en una disminución de la fuerza centrífuga para sedimentar las membranas pesadas (mitocondrias): mientras que el protocolo recomienda la centrifugación a 12000xg, nosotros hemos comprobado que 3000xg precipita mayoritariamente las mitocondrias y optimiza la segregación del RE. Una vez obtenidos los sedimentos mitocondriales, se lisaron en 15µl de tampón de lisis NP-40 cada uno y posteriormente se unieron los sedimentos mitocondriales de los duplicados. Finalmente se sometieron todas las fracciones obtenidas durante la purificación a medición de proteínas por el método de Bradford. Para el análisis por *western blot* y se usó 1µg de proteína total por carril en un gel de poliacrilamida.

5.2.2. Purificación de microsomas

Para el aislamiento y enriquecimiento de microsomas crudos procedentes de células Mef DKO y MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 se adaptó el protocolo del *Endoplasmic Reticulum Isolation Kit* (ER0100, Sigma). Se partió de un total de 2×10^8 células, consistiendo en 10 placas de 10cm de $6,7 \times 10^6$ células sembradas por tipo celular el día anterior. Al día siguiente se recogieron las células mediante raspador celular y se lavaron los sedimentos celulares dos veces con PBS 1x frío. A continuación se añadió tres

veces el volumen de cada sedimento celular del tampón hipotónico 1x (10mM HEPES [pH 7,8], 1mM EGTA, 25mM KCl) con 1% PIC (del inglés *Protease Inhibitor Cocktail*, cóctel de inhibidores de proteínas, Sigma) y 1mM de PMSF, seguido de una incubación de 20 min para permitir el hinchamiento celular. Trascurrido este tiempo, se volvió a centrifugar a 600xg y 4°C durante 5 min. Se aspiró el sobrenadante y se añadió dos veces el volumen celular del tampón isotónico 1x (10mM HEPES [pH 7,8], 250mM sacarosa, 1mM EGTA, 25mM KCl) de 1% PIC y 1mM de PMSF, para romper posteriormente las células con 100 pases por un homogenizador tipo *Dounce* de 1ml ("*tight fit pestle*"), un proceso que produce la lisis de al menos un 50% de material celular, según se comprobó mediante el colorante para células viables *Trypan Blue* (Sigma). Se centrifugaron los núcleos y los restos celulares a 1000xg y 4°C durante 10min. El sobrenadante postnuclear fue sometido a una homogenización de tipo *dounce* aplicando aproximadamente 50 pases para facilitar la disgregación de mitocondrias y RE, seguido de una centrifugación a 3000xg y 4°C durante 15min. Se apartó una alícuota de este sobrenadante postmitocondrial y el resto se sometió a una centrifugación de 100000 xg a 4°C durante 1h para obtener la fracción microsomal en forma de precipitado, siendo el sobrenadante la fracción citosólica. Se lavaron los sedimentos microsomales una vez con tampón isotónico antes de lisarlos en tampón de lisis NP-40. Los precipitados microsomales requirieron un paso de homogenización adicional mediante un émbolo de teflón. Para el análisis de *western blot* se usaron 10µg de proteína total por carril.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO Y CUANTIFICACIÓN DE MUERTE CELULAR

6.1. INCORPORACIÓN DE IODURO DE PROPIDIO

Para determinar el porcentaje de muerte total de un determinado cultivo celular se realizaron ensayos de incorporación de yoduro de propidio (IP, BD Pharmingen) mediante citometría de flujo. Para estos experimentos se partió de MEF crecidos en placas de 24 pocillos y procesados según los requerimientos de cada experimento. El día del análisis se recogieron primero las células flotantes del cultivo, así como las células adherentes mediante tripsinización, y se centrifugaron las muestras a 650xg durante 10min. A continuación se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células directamente en 100µl de DMEM completo con 1µg/ml de yoduro de propidio, seguido de una incubación de 15min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Posteriormente se añadieron 400µl de DMEM completo a cada tubo y se sometieron las muestras inmediatamente al análisis por citometría de flujo utilizando el sistema FACScalibur (Becton Dickinson). La población celular se identificó en función de los parámetros de *forward* y *side scatter* en modo logarítmico. La fluorescencia emitida por IP, y por tanto su incorporación en el ADN, se determinó analizando la población celular en el canal FL3. De cada muestra se adquirieron

entre $1-2 \times 10^5$ células con el programa Cell Quest™ 3.2 (Becton Dickinson). El análisis posterior se efectuó con el *software* WinMDI 2.8 (Microsoft®).

6.2. MARCAJE DE FOSFATIDILSERINA CON ANEXINA V-FITC

La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección de fosfatidilserina. Este fosfolípido de membrana celular es expuesto en la cara externa de la célula debido a la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, uno de los procesos más tempranos del proceso apoptótico. La Anexina V-FITC es una proteína conjugada al isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*) (BD Pharmingen), que se une al fosfolípido con alta afinidad en presencia de calcio. Para el análisis de muestras se siguió básicamente el mismo protocolo arriba descrito para la incorporación de IP, sólo que en este caso se efectuó una doble tinción con IP y Anexina V-FITC. Para ello, se substituyó el DMEM completo por DMEM suplementado hasta una concentración de 2,5mM de CaCl_2 . Las muestras se resuspendieron en 100 μl de este medio al que se había añadido 5 μl de solución comercial Anexina V-FITC, además de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IP. En experimentos preliminares se usó en vez de DMEM el tampón de unión recomendada por la casa comercial, y se observó que las células MEF-*wt* son sensibles e inestables en esta solución, lo que provocó aproximadamente un 30% de muerte basal en los controles. Por ello, se empleó posteriormente el uso de DMEM, que contenía suero y garantizaba la estabilidad de las células durante la incubación. Además, se suplementó el medio con calcio para alcanzar la misma concentración que está presente en el tampón comercial y facilitar así la unión de Anexina V a la fosfatidilserina.

El uso simultáneo de Anexina V e IP permite diferenciar entre células viables, células apoptóticas y aquellas células que han sufrido necrosis: La población apoptótica se caracteriza por el marcaje con Anexina V-FITC y la exclusión de IP, ya que aún tiene la membrana celular intacta. En cambio, células necróticas o células apoptóticas en estado avanzado de apoptosis ya han perdido la integridad de membrana, por lo cual captan tanto Anexina V-FITC como IP. Las células viables excluyen ambos marcadores.

La fluorescencia emitida por (Anexina V-) FITC se captó en FL1, mientras la de IP en el canal FL3. Previamente ambas fluorescencias habían sido compensadas adecuadamente. Los programas de adquisición y análisis fueron los mismos que los utilizados en los ensayos de incorporación con yoduro de propidio solo.

7. ENSAYOS DE MANIPULACIÓN Y MEDICIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR

7.1. MEDICIONES DE CALCIO RETICULAR MEDIANTE EL “REPORTERO” GENÉTICO YC3.3

Para comparar la concentración de calcio de RE vacuolizado frente a RE normal en células HEK-293T se aplicó la técnica de FRET (transferencia de energía entre fluorocromos, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) utilizando el indicador de calcio reticular reYC3.3 (del inglés *Yellow Cameleon*).

FRET es un proceso en el que la energía de un fluoróforo donador excitado es transferida a un fluoróforo aceptor en estado basal si las moléculas del donador y del aceptor están muy próximas (habitualmente 10-100Å) y el espectro de absorción del aceptor se solapa con el espectro de emisión de fluorescencia del donador. Por ello, el empleo de FRET permite realizar estudios de colocalización y/o interacción entre biomoléculas, así como analizar cambios conformacionales dentro de una proteína dada.

El indicador de calcio reticular de afinidad media reYC3.3 (rango de medición de 0,5-100µM) es una proteína quimérica de las llamadas proteínas “tipo cameleón”. Su estructura consta básicamente de dos derivados de GFP (CFP y YFP, del inglés *Cyan Fluorescent Protein* y *Yellow Fluorescent Protein*, respectivamente), que emiten fluorescencia a longitudes de onda diferentes y están conectados flexiblemente a través de la calmodulina, una proteína sensible a calcio.

El uso de reYC3.3 permite monitorizar la concentración de calcio en el RE dado que, en presencia de calcio su unión a calmodulina, introduce un cambio conformacional en la proteína reYC3.3 excitada a 440nm (azul), lo que conlleva el acercamiento de los dos fluoróforos CFP e YFP. Una vez próximas, se produce FRET por excitación de YFP mediante CFP, por lo que YFP emite a 535nm (amarillo). En estado basal, es decir en ausencia de calcio, CFP excitado a 440nm es incapaz de excitar YFP y por tanto emite a 480nm (cian) (Figura 44). El coeficiente de las intensidades de emisión a 535/480nm es una medida de la cantidad de calcio unido a calmodulina (CaM), y por tanto proporcional a la concentración de calcio en el orgánulo.

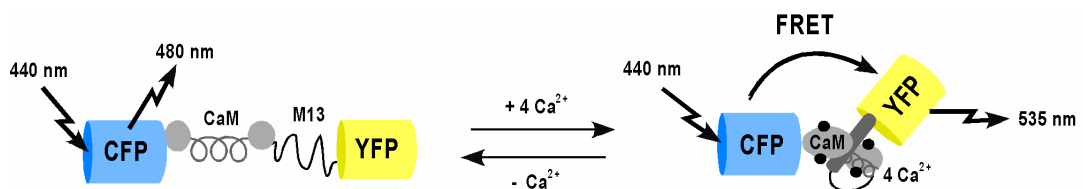


Figura 44. Transferencia de Energía entre Fluorocromos (FRET) mediante el indicador reYC3.3 (adaptado de Miyawaki *et al.*, *Nature*, 1997).

Los ensayos de mediciones de FRET se efectuaron con células HEK-293T *in vivo*. Para ello se sembraron células sobre cubreobjetos y se transfectaron al día siguiente con plásmidos que expresaban Bak y Bcl-X_L en presencia de RFP citosólico (proteína fluorescente roja, del inglés *Red Fluorescent*

Protein) y reYC3.3. Al las 36 h de la transfección se transfirieron los cubreobjetos una placa de fondo de cristal que contiene DMEM completo, y apta para su uso en microscopía (WillCo) con muestras *in vivo*.

La obtención de FRET se llevó a cabo mediante microscopía confocal con un objetivo 63x, adaptando las longitudes de ondas de excitación y emisión al equipamiento del microscopio confocal usado. Las células fueron estimuladas con el láser de argón a 458nm, y posteriormente se determinó el coeficiente de intensidades de emisión a 535/480nm para cada píxel, utilizando el programa LSM-510 de Zeiss. Dado que el microscopio utilizado no estaba equipado con un canal para captar emisiones a 480nm, se midieron las emisiones en otro canal capaz de captar el rango de 480nm a 535nm, del que se restaron las emisiones que se captaba en un canal a 535nm, siendo la diferencia el valor de emisión de 480nm. Por tanto, el cálculo para el coeficiente era $535/(480+535)-535nm$.

Para la medición, en primer lugar se localizaron células con RE vacuolizado próximas a otras no vacuolizadas con un nivel de transfección comparable según el nivel de expresión de RFP. Posteriormente, se obtuvieron los coeficientes de emisión FRET (535/480nm) para ambos tipos de células. Para ello se marcó una línea transversal sobre ambas células con objeto de generar un perfil de intensidades FRET tanto de RE vacuolizado como no vacuolizado (RE normal). Como control positivo de que las intensidades FRET de células vacuolizadas y no vacuolizadas son regulables por calcio, se trataron las células con TG y EGTA. Para ello se transfectaron las HEK-293T con Bak/Bcl-X_L y reYC3.3, y a las 36h se sometieron tanto células vacuolizadas como las no vacuolizadas al mismo análisis arriba descrito. Posteriormente se trataron las células simultáneamente con 2mM EGTA y 200μM TG, y, trascurridos 15min, tiempo al que se produjo habitualmente la diferencia máxima, se captaron las intensidades FRET de nuevo. Los resultados se representaron como valores medios de las intensidades FRET de una sección de RE de interés tanto para células control como para células tratadas. Finalmente se mostró el promedio de los valores de al menos cinco células por condición experimental.

7.2. MEDICIONES DE CALCIO RETICULAR MEDIANTE EL “REPORTERO” QUÍMICO FURA-2

Para comparar los niveles de calcio reticular entre MEF-*wt*, DKO, MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6 se empleó un ensayo de medición indirecta: en lugar de medir el calcio en el RE, se midió el calcio citosólico liberable del RE por TG (del inglés *Thapsigargin*) (Sigma) usando el indicador fluorescente de calcio citosólico, Fura-2-AM.

TG es un inhibidor efectivo de la familia de bombas de calcio dependiente de ATP que está presente en la membrana del retículo sarcoendoplasmático, la llamada SERCA (del inglés *Sarcoplasmic or Endoplasmic reticulum Ca 2 ATPase*). La TG es ampliamente utilizada para provocar la salida de calcio del RE y así elevar transitoriamente los niveles de calcio citoplasmático (Treiman, Caspersen et al. 1998;

Breckenridge, Germain et al. 2003). Este efecto es indirecto, porque el bloqueo de la bomba impide que ésta contrarreste la difusión de calcio al citoplasma a través de los canales de salida de calcio del RE.

La medición de la concentración de calcio liberado al citoplasma se llevó a cabo mediante el indicador ratiométrico de calcio Fura-2 en forma de acetoximetil éster (AM) (Molecular Probes), que ha sido utilizado ampliamente para mediciones de calcio citosólico. A través de la modificación de grupos ácidos carboxílicos con el éster, la sustancia pierde su polaridad y, por tanto, atraviesa fácilmente las membranas de células intactas. Una vez en la célula, esterasas intracelulares inespecíficas procesan la molécula cortando los grupos éster de modo que la molécula queda así retenida en el citoplasma. Tras la unión a calcio, Fura-2 sufre un cambio en la absorción, lo que puede ser detectado al captar los valores de fluorescencia emitida a 510nm tras excitar a dos longitudes de onda diferentes (340 y 380nm). Con la primera longitud de onda de excitación, la intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración de calcio, mientras que tras la excitación a 380nm, la intensidad de fluorescencia disminuye. La concentración relativa de calcio citosólico se calcula a partir del cociente de intensidades emitidas a las dos longitudes de excitación, 340/380.

Para el ensayo de medición de calcio reticular liberable por TG se adaptó un protocolo de la Información suplementaria del artículo de Scorrano *et al.* (publicado en *Science* en 2003). Las células fueron sembradas en placas de 10cm con dos días de anterioridad. El día del experimento se partió de una densidad celular de un 80%. Se lavaron las células tres veces con HBSS (del inglés *Hank's balanced salt solution* 1x, Invitrogen, sin Ca^{2+} , Mg^{2+} ni rojo fenol) al 5% de suero para eliminar el DMEM del cultivo (que sí contiene colorante y calcio y, por tanto, puede interferir en la medición). Seguidamente, las células fueron cargadas con el colorante Fura-2-AM (2,5 μ M, premezclado con un volumen igual de Pluronic (Molecular Probes), un detergente que facilita su solubilidad) a 37°C durante 30min en medio HBSS (5% suero). Posteriormente se lavaron las células tres veces con HBSS (5% suero) y se desesterificó el Fura-2 durante 5 min en HBSS a 5% suero y 37°C, seguido de tres lavados con HBSS. Se recogieron las células con un raspador celular y se resuspendieron en HBSS a una densidad de 2x10⁶ células/ml para medir posteriormente cantidades iguales de células. Los ensayos de medición de fluorescencia emitida por Fura-2 se llevaron a cabo utilizando un fluorímetro termostatzado FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon) con el programa *FluorEssence* (Horiba Jobin Yvon), siendo la longitud de onda de emisión 510nm y de excitación de 340 y 380nm (0,5s de tiempo de integración, apertura de 5). Para la medición las células fueron mantenidas a 37°C en agitación, y en primer lugar se estableció una línea base estable tanto a 340 como a 380nm. Después se trataron las células con TG a 5 μ M y se recogieron los datos de las absorbancias a ambas longitudes de ondas cada 30 segundos hasta estancarse al alcanzar los 4min. Los valores se representaron como el coeficiente de 340/380 en función del tiempo y se integró el área de la curva resultante como medida de la cantidad de calcio que había sido liberado del RE al citoplasma. Finalmente se calculó la media de las cantidades de calcio de dos experimentos representativos para cada tipo de

MEF ensayado, y se presentaron los datos como valores relativos con respecto al valor de las células MEF-*wt*.

7.3. UTILIZACIÓN DE AGENTES MODULADORES DEL CALCIO CELULAR

7.3.1. Dantrolina y cafeína

Con el fin de determinar la implicación de los canales de calcio RyR en la generación de vacuolas citoplasmáticas, se llevaron a cabo experimentos usando los compuestos dantrolina (Sigma) y cafeína (Sigma), cuya capacidad de modulación de los RyR ha sido descrita anteriormente (Ozawa 2001; Zhao, Li et al. 2001; Fill y Copello 2002). Para ello se transfectaron células HEK-293T con GFP, bien en presencia de Bak y Bcl-X_L o bien de BakΔBH3. En el caso de la dantrolina, se trataron las células a 50μM 1 h después de la transfección, y a las 36 h se fijaron y montaron. En el caso de la cafeína, las células fueron tratadas a las 36 h de la transfección (durante 3,5 h a 20mM).

7.3.2. TG, C₂-ceramida y H₂O₂

Con el fin de analizar si las proteínas BH3-*only* inducen su efecto de forma mediada por calcio del RE, se hizo uso de diferentes agentes químicos, ya descritos anteriormente, que presentan capacidad de modular calcio del RE (Scorrano, Oakes et al. 2003). Para ello, se usaron células MEF-DKO-AU1-Bakcb5#2 y #6, que se compararon con células MEF-*wt*, *Bax*^{-/-} y DKO. El análisis consistió en la activación de las caspasas 9 y 3 por *western blot* y la movilización de citocromo c por inmunofluorescencia.

Para tratamientos con TG se usaron células sembradas a densidades relativamente altas, con el objeto de compensar la reducción de número de células por pérdida de adherencia durante el tratamiento. Para el análisis mediante *western blot*, se sembraron las líneas celulares, bien en placas de 10cm (~ 2x10⁶ células) o bien de 6 pocillos (~400 000 células/ pocillo), mientras para ensayos de IF se sembraron en placas de p24 y sobre cubreobjetos (~80000 células/ pocillo). En los ensayos de IF frente citocromo c se pretrataron las células durante 1h con 100μM z-VAD-fmk (BD Pharmingen), que se mantuvo en el medio hasta el final del experimento. Tanto la recogida de células como la técnica de *western blot* y la técnica de inmunofluorescencia se realizaron como se ya ha descrito.

Para el análisis de *western blot* utilizando C₂-Ceramida y H₂O₂ se sembraron las células a las mismas densidades descritas para TG. Se trataron las células con C₂-Ceramida (100μM) durante 12, 17 y 24 horas, o con H₂O₂(1mM) durante 8 y 17 horas.

7.3.3. Bapta-AM y 2-APB

Para realizar experimentos con el quelante Bapta en forma de acetoximetil éster Bapta-AM (Invitrogen) se sembraron células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 #2 y #6 usando un número celular ligeramente más alto para compensar la reducción del número de células por pérdida de adhesión al sustrato durante el tratamiento. Al día siguiente se infectaron las células con el virus adecuado, salvo en el caso de un posterior procesamiento de las células para IF, donde se infectaron adicionalmente en presencia de 100µM z-VAD-fmk. El tratamiento con Bapta-AM se realizó entre 7 y 8 horas tras la infección. Primero se hicieron dos lavados con DMEM sin SFB para eliminar tanto el suero como el virus. Para la preparación del medio de carga se mezclaron, en un primer paso, o un volumen de Bapta-AM o un volumen de DMSO (para los controles) con dos volúmenes del detergente no iónico Pluronic® F-127 (Invitrogen). El uso de Pluronic facilita la solubilidad de Bapta-AM, dado que la forma esterificada es relativamente insoluble en soluciones acuosas. En un segundo paso se añadió la premezcla Bapta-AM (o DMSO)/Pluronic al DMEM (sin suero) para llegar a una concentración final de 15µM. Se incubaron las células con esta solución durante 30 minutos a 37°C en el incubador (en el caso de p24 se usaron 0,5 o 1ml y en el caso de pocillos de p6 1,5ml). Una vez transcurrido el tiempo de carga del quelante se lavaron las células dos veces con DMEM completo y finalmente se dejaron en DMEM completo nuevo (células en p6 en 2ml medio, p24 para ensayos de citometría en 0,5 a 1ml, mientras que las células sembradas en p24 para IF se añadió 0,5ml DMEM completo llevando 100µM z-VAD-fmk como concentración final) hasta su procesamiento 8-9 horas después, es decir, a las 17 horas (en el caso de IF o lisis celular) o 24 horas (para ensayos de muerte celular mediante citometría) tras la infección.

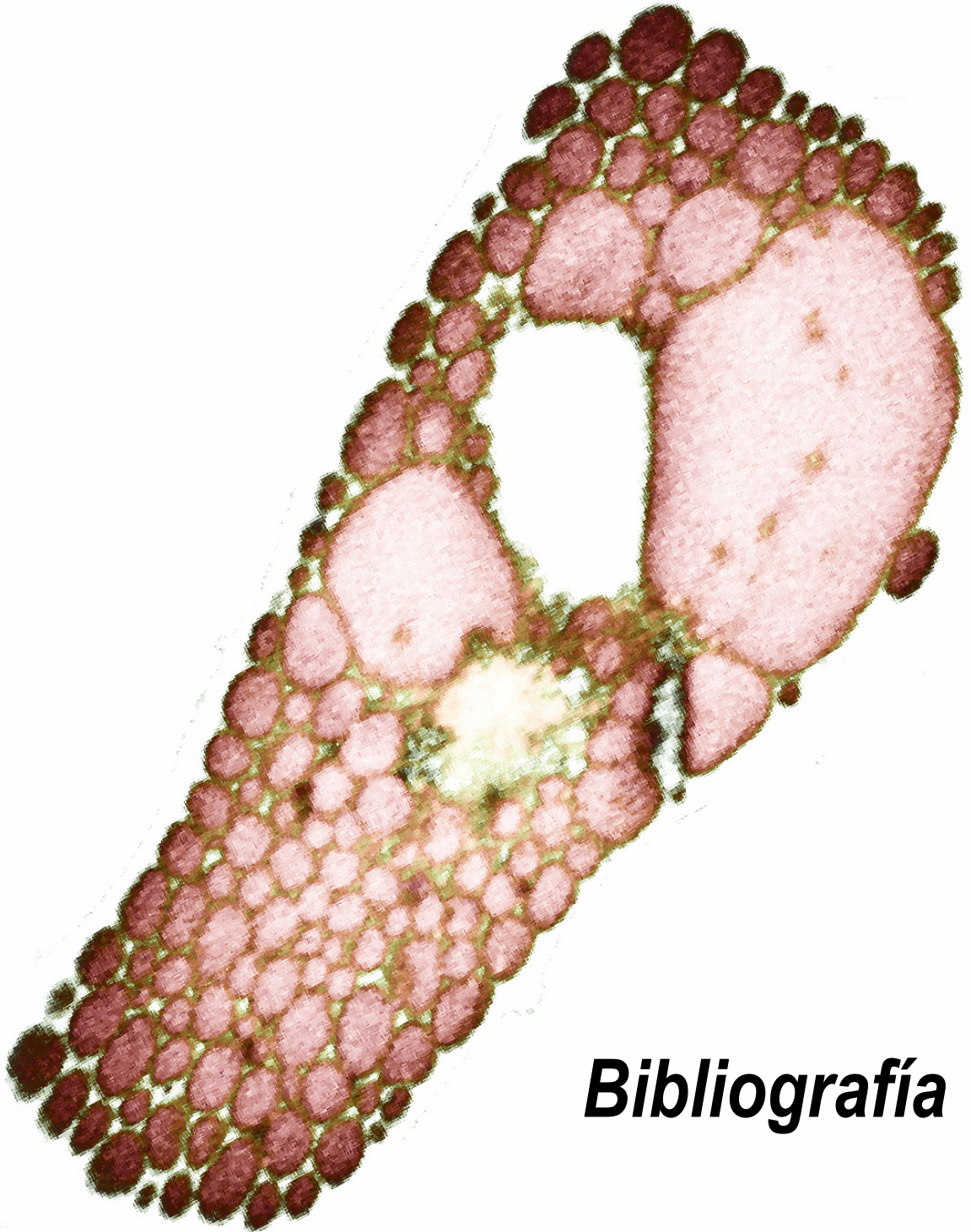
El 2-APB (del inglés *2-Aminoethyl diphenylborinate*) es un compuesto permeable que se ha descrito como inhibidor selectivo de receptores de trifosfato de inositol (IP₃R, del inglés *Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor*) localizados en la membrana del RE y encargados de liberar calcio desde el lumen reticular al citoplasma. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que su función más relevante podría basarse en un efecto sobre la entrada de calcio extracelular por los SOCC (del inglés *Store-Operated Calcium Channel*) a través de los canales de calcio de la membrana (Bootman, Collins et al. 2002; Peppiatt, Collins et al. 2003).

Para utilizar este compuesto, se infectaron células MEF-DKO-AU1-Bakcb5 #2 y #6 en pocillos de p6 como anteriormente se ha descrito. Trascurridas 7-8 horas desde la infección, se lavaron los pocillos dos veces con DMEM completo y se incubaron con DMEM completo, bien con 2-APB a una concentración final de 75µM, o bien con DMSO solo hasta lizarlas a las 17 horas tras la infección.

8. ARN DE INTERFERENCIA (ARNi)

Para los ensayos de ARN de interferencia se usaron mezclas de cuatro oligonucleótidos de ARN de doble cadena prediseñados contra la molécula IRE1α murina (On-TargetPlus, Dharmacon) que tenían

las siguientes secuencias: 5'gaaagguggugcacaucuu 3', 5'cgucauugcucgugaauguu 3', 5'ugaacuacuugaggaauuu 3', 5'ugacgaaacuuccuuuuuu 3'. Los ARNi control (Dharmacon) contienen una mezcla de cuatro dúplex sin homología completa con ningún gen murino. Para la transfección de células MEF con estos ARNi se sembró el cultivo el día anterior en placas de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente el 30%. A las 24 horas se transfectaron las células usando el lípido DharmaFECT1 (Dharmacon) siguiendo las instrucciones del fabricante.



Bibliografía

- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-32.
- Adachi, T., W. W. Schamel, et al. (1996). "The specificity of association of the IgD molecule with the accessory proteins BAP31/BAP29 lies in the IgD transmembrane sequence." *Embo J* **15**(7): 1534-41.
- Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene* **26**(9): 1324-37.
- Adler, H. T., R. Chinery, et al. (1999). "Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins." *Mol Cell Biol* **19**(10): 7050-60.
- Akiyama, T., P. Bouillet, et al. (2003). "Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim." *Embo J* **22**(24): 6653-64.
- Alcalá, S., M. Klee, et al. (2007). "A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release." *Oncogene*.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Alvarez, C. and E. S. Sztul (1999). "Brefeldin A (BFA) disrupts the organization of the microtubule and the actin cytoskeletons." *Eur J Cell Biol* **78**(1): 1-14.
- Annis, M. G., E. L. Soucie, et al. (2005). "Bax forms multispanning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis." *Embo J* **24**(12): 2096-103.
- Annis, M. G., J. A. Yethon, et al. (2004). "There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 115-23.
- Annis, M. G., N. Zamzami, et al. (2001). "Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event." *Oncogene* **20**(16): 1939-52.
- Antignani, A. and R. J. Youle (2006). "How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?" *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 685-9.
- Antonsson, B. and J. C. Martinou (2000). "The Bcl-2 protein family." *Exp Cell Res* **256**(1): 50-7.
- Arnaudeau, S., M. Frieden, et al. (2002). "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria." *J Biol Chem* **277**(48): 46696-705.
- Arnaudeau, S., W. L. Kelley, et al. (2001). "Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions." *J Biol Chem* **276**(31): 29430-9.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.

- Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2007). "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death." Nat Cell Biol **9**(5): 550-5.
- Bakhshi, A., J. P. Jensen, et al. (1985). "Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18." Cell **41**(3): 899-906.
- Bassik, M. C., L. Scorrano, et al. (2004). "Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis." Embo J **23**(5): 1207-16.
- Basso, E., L. Fante, et al. (2005). "Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D." J Biol Chem **280**(19): 18558-61.
- Bathori, G., G. Csordas, et al. (2006). "Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)." J Biol Chem **281**(25): 17347-58.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Boatright, K. M., M. Renatus, et al. (2003). "A unified model for apical caspase activation." Mol Cell **11**(2): 529-41.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-31.
- Boehning, D., R. L. Patterson, et al. (2003). "Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis." Nat Cell Biol **5**(12): 1051-61.
- Bogoyevitch, M. A. and B. Kobe (2006). "Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 1061-95.
- Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, et al. (2002). "2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release." Faseb J **16**(10): 1145-50.
- Bootman, M. D., O. H. Petersen, et al. (2002). "The endoplasmic reticulum is a focal point for coordination of cellular activity." Cell Calcium **32**(5-6): 231-4.
- Borgese, N., M. Francolini, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 358-64.
- Borradaile, N. M., X. Han, et al. (2006). "Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death." J Lipid Res **47**(12): 2726-37.
- Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**(5445): 1735-8.

- Bouillet, P., J. F. Purton, et al. (2002). "BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes." Nature **415**(6874): 922-6.
- Bouillet, P. and A. Strasser (2002). "BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death." J Cell Sci **115**(Pt 8): 1567-74.
- Boya, P., I. Cohen, et al. (2002). "Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization." Cell Death Differ **9**(4): 465-7.
- Boyce, M., K. F. Bryant, et al. (2005). "A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress." Science **307**(5711): 935-9.
- Boyd, J. M., G. J. Gallo, et al. (1995). "Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins." Oncogene **11**(9): 1921-8.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, et al. (2003). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." Oncogene **22**(53): 8608-18.
- Breckenridge, D. G., M. Nguyen, et al. (2002). "The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4331-6.
- Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, et al. (2003). "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol." J Cell Biol **160**(7): 1115-27.
- Brooks, C., Q. Wei, et al. (2007). "Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(28): 11649-54.
- Brush, M. H., D. C. Weiser, et al. (2003). "Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2." Mol Cell Biol **23**(4): 1292-303.
- Calfon, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature **415**(6867): 92-6.
- Callus, B. A. and D. L. Vaux (2007). "Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical." Cell Death Differ **14**(1): 73-8.
- Cartron, P. F., T. Gallenne, et al. (2004). "The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA." Mol Cell **16**(5): 807-18.
- Castilla, C., B. Congregado, et al. (2006). "Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak." Endocrinology **147**(10): 4960-7.

- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, et al. (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-65.
- Cleary, M. L. and J. Sklar (1985). "Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7439-43.
- Clem, R. J., M. Fechheimer, et al. (1991). "Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells." Science **254**(5036): 1388-90.
- Cohen, G. M., X. M. Sun, et al. (1994). "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." J Immunol **153**(2): 507-16.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-607.
- Crompton, M., E. Barksby, et al. (2002). "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death." Biochimie **84**(2-3): 143-52.
- Cuconati, A., C. Mukherjee, et al. (2003). "DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells." Genes Dev **17**(23): 2922-32.
- Chae, H. J., H. R. Kim, et al. (2004). "BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress." Mol Cell **15**(3): 355-66.
- Chandra, D., G. Choy, et al. (2005). "Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2." J Biol Chem **280**(19): 19051-61.
- Chang, S. H., P. C. Phelps, et al. (2000). "Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E)." Am J Pathol **156**(2): 637-49.
- Chen, L., S. N. Willis, et al. (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
- Chen, R., I. Valencia, et al. (2004). "Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate." J Cell Biol **166**(2): 193-203.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**(3): 705-11.
- Cheung, H. H., N. Lynn Kelly, et al. (2006). "Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs." Exp Cell Res **312**(12): 2347-57.

- Chittenden, T., C. Flemington, et al. (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." *Embo J* **14**(22): 5589-96.
- Chittenden, T., E. A. Harrington, et al. (1995). "Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak." *Nature* **374**(6524): 733-6.
- Choi, D. W. (1992). "Excitotoxic cell death." *J Neurobiol* **23**(9): 1261-76.
- Choi, S. S., I. C. Park, et al. (1995). "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow." *Oncogene* **11**(9): 1693-8.
- Danial, N. N., C. F. Gramm, et al. (2003). "BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis." *Nature* **424**(6951): 952-6.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-19.
- Danial, N. N., L. D. Walensky, et al. (2008). "Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival." *Nat Med* **14**(2): 144-53.
- Dansen, T. B., J. Whitfield, et al. (2006). "Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo." *J Biol Chem* **281**(16): 10890-5.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-67.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* **144**(5): 891-901.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, et al. (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." *Curr Biol* **10**(19): 1201-4.
- Distelhorst, C. W., M. Lam, et al. (1996). "Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion." *Oncogene* **12**(10): 2051-5.
- Distelhorst, C. W. and T. S. McCormick (1996). "Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca²⁺ fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells." *Cell Calcium* **19**(6): 473-83.
- Dolce, V., P. Scarcia, et al. (2005). "A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution." *FEBS Lett* **579**(3): 633-7.
- Donepudi, M., A. Mac Sweeney, et al. (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* **11**(2): 543-9.
- Donovan, N., E. B. Becker, et al. (2002). "JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery." *J Biol Chem* **277**(43): 40944-9.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Du, K., S. Herzig, et al. (2003). "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver." *Science* **300**(5625): 1574-7.

- Ekert, P. G., J. Silke, et al. (2001). "DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9." J Cell Biol **152**(3): 483-90.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." Cell **44**(6): 817-29.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Enders, A., P. Bouillet, et al. (2003). "Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells." J Exp Med **198**(7): 1119-26.
- Erlacher, M., V. Labi, et al. (2006). "Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction." J Exp Med **203**(13): 2939-51.
- Fiebig, A. A., W. Zhu, et al. (2006). "Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line." BMC Cancer **6**: 213.
- Fill, M. and J. A. Copello (2002). "Ryanodine receptor calcium release channels." Physiol Rev **82**(4): 893-922.
- Fleckenstein, A., J. Janke, et al. (1974). "Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology." Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab **4**: 563-80.
- Foskett, J. K., C. White, et al. (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels." Physiol Rev **87**(2): 593-658.
- Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, et al. (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5723-8.
- Futami, T., M. Miyagishi, et al. (2005). "Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors." J Biol Chem **280**(1): 826-31.
- Gardai, S. J., D. A. Hildeman, et al. (2004). "Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils." J Biol Chem **279**(20): 21085-95.
- Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." Cell Death Differ **13**(9): 1423-33.
- Germain, M., J. P. Mathai, et al. (2002). "BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria." J Biol Chem **277**(20): 18053-60.
- Gibson, L., S. P. Holmgren, et al. (1996). "bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival." Oncogene **13**(4): 665-75.

- Gillet, G., M. Guerin, et al. (1995). "A Bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus." Embo J **14**(7): 1372-81.
- Gillissen, B., F. Essmann, et al. (2003). "Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway." Embo J **22**(14): 3580-90.
- Gillissen, B., F. Essmann, et al. (2007). "Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis." J Cell Biol **179**(4): 701-15.
- Gincel, D., H. Zaid, et al. (2001). "Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function." Biochem J **358**(Pt 1): 147-55.
- Giorgi, C., A. Romagnoli, et al. (2008). "Ca(2+) signaling, mitochondria and cell death." Curr Mol Med **8**(2): 119-30.
- Griffiths, G. J., L. Dubrez, et al. (1999). "Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 903-14.
- Hacki, J., L. Egger, et al. (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**(19): 2286-95.
- Hajnoczky, G., G. Csordas, et al. (2000). "Mitochondrial calcium signaling driven by the IP3 receptor." J Bioenerg Biomembr **32**(1): 15-25.
- Hajnoczky, G., G. Csordas, et al. (2002). "Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria." Cell Calcium **32**(5-6): 363-77.
- Hajnoczky, G., L. D. Robb-Gaspers, et al. (1995). "Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria." Cell **82**(3): 415-24.
- Han, J., C. Flemington, et al. (2001). "Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11318-23.
- Han, Y., Y. Kim, et al. (2006). "N-acetylphosphatidylethanolamine-induced apoptosis of Jurkat cells is mediated by the conformational change in Bak." Apoptosis **11**(4): 581-8.
- He, H., M. Lam, et al. (1997). "Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2." J Cell Biol **138**(6): 1219-28.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, et al. (1998). "Bik, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist." J Biol Chem **273**(14): 7783-6.
- Henderson, S., M. Rowe, et al. (1991). "Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death." Cell **65**(7): 1107-15.

- Herrera, P. L., D. M. Harlan, et al. (2000). "A mouse CD8 T cell-mediated acute autoimmune diabetes independent of the perforin and Fas cytotoxic pathways: possible role of membrane TNF." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 279-84.
- Hetz, C., P. Bernasconi, et al. (2006). "Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha." Science **312**(5773): 572-6.
- Hetz, C. A. (2007). "ER Stress Signaling and the BCL-2 Family of Proteins: From Adaptation to Irreversible Cellular Damage." Antioxid Redox Signal.
- Hildeman, D. A., Y. Zhu, et al. (2002). "Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim." Immunity **16**(6): 759-67.
- Hinds, M. G. and C. L. Day (2005). "Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants." Curr Opin Struct Biol **15**(6): 690-9.
- Hofmann, K., P. Bucher, et al. (1997). "The CARD domain: a new apoptotic signalling motif." Trends Biochem Sci **22**(5): 155-6.
- Horvitz, H. R., P. W. Sternberg, et al. (1983). "Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 2**: 453-63.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12401-6.
- Hsu, Y. T., K. G. Wolter, et al. (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3668-72.
- Hsu, Y. T. and R. J. Youle (1998). "Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations." J Biol Chem **273**(17): 10777-83.
- Hu, P., Z. Han, et al. (2004). "Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death." J Biol Chem **279**(47): 49420-9.
- Hu, P., Z. Han, et al. (2006). "Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression." Mol Cell Biol **26**(8): 3071-84.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-42.
- Ichimiya, M., S. H. Chang, et al. (1998). "Effect of Bcl-2 on oxidant-induced cell death and intracellular Ca²⁺ mobilization." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): C832-9.
- Ink, B., M. Zornig, et al. (1997). "Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells." Mol Cell Biol **17**(5): 2468-74.

- Inohara, N., L. Ding, et al. (1997). "harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L)." Embo J **16**(7): 1686-94.
- Inohara, N., T. S. Gourley, et al. (1998). "Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death." J Biol Chem **273**(49): 32479-86.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- Jacobs, A. E., A. A. Benders, et al. (1991). "Effect of various agents on the cytoplasmic calcium concentration in cultured human muscle cells." Int J Biochem **23**(1): 93-9.
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 631-43.
- Jeffers, J. R., E. Parganas, et al. (2003). "Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways." Cancer Cell **4**(4): 321-8.
- Jimbo, A., E. Fujita, et al. (2003). "ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation." Exp Cell Res **283**(2): 156-66.
- Johnson, V. L., S. C. Ko, et al. (2000). "Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis." J Cell Sci **113** (Pt 17): 2941-53.
- Jones, R. G., T. Bui, et al. (2007). "The proapoptotic factors Bax and Bak regulate T Cell proliferation through control of endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis." Immunity **27**(2): 268-80.
- Joseph, S. K. and G. Hajnoczky (2007). "IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond." Apoptosis **12**(5): 951-68.
- Jouaville, L. S., F. Ichas, et al. (1995). "Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes." Nature **377**(6548): 438-41.
- Jurgensmeier, J. M., S. Krajewski, et al. (1997). "Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Biol Cell **8**(2): 325-39.
- Karbowski, M., K. L. Norris, et al. (2006). "Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis." Nature **443**(7112): 658-62.
- Kaufmann, T., S. Schlipf, et al. (2003). "Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane." J Cell Biol **160**(1): 53-64.
- Kawatani, M. and M. Imoto (2003). "Deletion of the BH1 domain of Bcl-2 accelerates apoptosis by acting in a dominant negative fashion." J Biol Chem **278**(22): 19732-42.
- Kepp, O., K. Rajalingam, et al. (2007). "Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis." Embo J **26**(3): 825-34.

- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kiefer, M. C., M. J. Brauer, et al. (1995). "Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak." Nature **374**(6524): 736-9.
- Kim, B. J., S. W. Ryu, et al. (2006). "JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells." J Biol Chem **281**(30): 21256-65.
- Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies." Nat Cell Biol **8**(12): 1348-58.
- Kim, J. K., K. S. Kim, et al. (2004). "Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain." Biochem Biophys Res Commun **316**(1): 18-23.
- Kim, P. K., M. G. Annis, et al. (2004). "During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria." Mol Cell **14**(4): 523-9.
- Kim, R. (2005). "Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death." Biochem Biophys Res Commun **333**(2): 336-43.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky, et al. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature **427**(6972): 360-4.
- Knudson, C. M., K. S. Tung, et al. (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." Science **270**(5233): 96-9.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." Nature **427**(6973): 461-5.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-73.
- Kozopas, K. M., T. Yang, et al. (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3516-20.
- Kubli, D. A., J. E. Ycaza, et al. (2007). "Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak." Biochem J **405**(3): 407-15.
- Kuida, K., T. S. Zheng, et al. (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**(6607): 368-72.
- Kumar, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." Cell Death Differ **14**(1): 32-43.
- Kumar, S. and M. F. Lavin (1996). "The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death." Cell Death Differ **3**(3): 255-67.

- Kuwana, T., L. Bouchier-Hayes, et al. (2005). "BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly." Mol Cell **17**(4): 525-35.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-42.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lam, M., G. Dubyak, et al. (1994). "Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6569-73.
- Lassus, P., X. Opitz-Araya, et al. (2002). "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization." Science **297**(5585): 1352-4.
- Lee, A. H., G. C. Chu, et al. (2005). "XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands." Embo J **24**(24): 4368-80.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol **23**(21): 7448-59.
- Lee, K., W. Tirasophon, et al. (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." Genes Dev **16**(4): 452-66.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2432-7.
- Lei, X., Y. Chen, et al. (2006). "Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2." Faseb J **20**(12): 2147-9.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-98.
- Leonard, J. P. and M. M. Salpeter (1979). "Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium." J Cell Biol **82**(3): 811-9.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-92.
- Ley, R., K. Balmanno, et al. (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim." J Biol Chem **278**(21): 18811-6.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.

- Li, J., B. Lee, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53." J Biol Chem **281**(11): 7260-70.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Lilliehook, C., S. Chan, et al. (2002). "Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling." Mol Cell Neurosci **19**(4): 552-9.
- Lin, J. H., H. Li, et al. (2007). "IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response." Science **318**(5852): 944-9.
- Lin, S. S., M. C. Bassik, et al. (2006). "PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **281**(32): 23003-12.
- Lindenboim, L., S. Kringel, et al. (2005). "Bak but not Bax is essential for Bcl-xS-induced apoptosis." Cell Death Differ **12**(7): 713-23.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.
- Liston, P., W. G. Fong, et al. (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." Oncogene **22**(53): 8568-80.
- Liu, X., S. Dai, et al. (2003). "The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function." Immunity **19**(3): 341-52.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-50.
- Luciano, F., A. Jacquet, et al. (2003). "Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function." Oncogene **22**(43): 6785-93.
- Lucken-Ardjomande, S. and J. C. Martinou (2005). "Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane." C R Biol **328**(7): 616-31.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
- Luo, X., Q. He, et al. (2005). "Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation." Cell Death Differ **12**(10): 1310-8.
- Mancini, M., C. E. Machamer, et al. (2000). "Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis." J Cell Biol **149**(3): 603-12.

- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, et al. (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." Genes Dev **18**(24): 3066-77.
- Marchenko, N. D., A. Zaika, et al. (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." J Biol Chem **275**(21): 16202-12.
- Martin, S. J. and D. R. Green (1995). "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?" Cell **82**(3): 349-52.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-56.
- Mathai, J. P., M. Germain, et al. (2002). "Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53." Oncogene **21**(16): 2534-44.
- Mathai, J. P., M. Germain, et al. (2005). "BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death." J Biol Chem **280**(25): 23829-36.
- Matsumoto, M., M. Minami, et al. (1996). "Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells." FEBS Lett **395**(2-3): 143-7.
- McCullough, K. D., J. L. Martindale, et al. (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol **21**(4): 1249-59.
- Meier, P., A. Finch, et al. (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.
- Mimnaugh, E. G., W. Xu, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum vacuolization and valosin-containing protein relocalization result from simultaneous hsp90 inhibition by geldanamycin and proteasome inhibition by velcade." Mol Cancer Res **4**(9): 667-81.
- Ming, L., P. Wang, et al. (2006). "PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells." J Biol Chem **281**(23): 16034-42.
- Miyawaki, A., J. Llopis, et al. (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." Nature **388**(6645): 882-7.
- Moldoveanu, T., Q. Liu, et al. (2006). "The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site." Mol Cell **24**(5): 677-88.
- Moretti, L., A. Attia, et al. (2007). "Crosstalk between Bak/Bax and mTOR signaling regulates radiation-induced autophagy." Autophagy **3**(2): 142-4.
- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." J Biol Chem **277**(37): 34287-94.

- Morishima, N., K. Nakanishi, et al. (2004). "Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis." J Biol Chem **279**(48): 50375-81.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, et al. (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature **381**(6580): 335-41.
- Mund, T., A. Gewies, et al. (2003). "Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum." Faseb J **17**(6): 696-8.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.
- Murakami, Y., E. Aizu-Yokota, et al. (2007). "Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and cell death by the overexpression of Bcl-xL or Bcl-2." J Biochem **141**(3): 401-10.
- Muriel, M. P., N. Lambeng, et al. (2000). "Mitochondrial free calcium levels (Rhod-2 fluorescence) and ultrastructural alterations in neuronally differentiated PC12 cells during ceramide-dependent cell death." J Comp Neurol **426**(2): 297-315.
- Murphy, A. N., D. E. Bredesen, et al. (1996). "Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9893-8.
- Muscarella, D. E. and S. E. Bloom (2007). "The contribution of c-Jun N-terminal kinase activation and subsequent Bcl-2 phosphorylation to apoptosis induction in human B-cells is dependent on the mode of action of specific stresses." Toxicol Appl Pharmacol.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." Nature **434**(7033): 652-8.
- Nakagawa, T. and J. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 887-94.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature **403**(6765): 98-103.
- Nakajima, K., H. Hirose, et al. (2004). "Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion." Embo J **23**(16): 3216-26.
- Nakamura, K., E. Bossy-Wetzel, et al. (2000). "Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 731-40.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-94.
- Ng, F. W., M. Nguyen, et al. (1997). "p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **139**(2): 327-38.

- Nguyen, M., D. G. Breckenridge, et al. (2000). "Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria." Mol Cell Biol **20**(18): 6731-40.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, et al. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." Genes Dev **16**(11): 1345-55.
- Nishitoh, H., M. Saitoh, et al. (1998). "ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2." Mol Cell **2**(3): 389-95.
- Nutt, L. K., J. Chandra, et al. (2002). "Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis." J Biol Chem **277**(23): 20301-8.
- Nutt, L. K., A. Pataer, et al. (2002). "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores." J Biol Chem **277**(11): 9219-25.
- O'Connor, L., A. Strasser, et al. (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." Embo J **17**(2): 384-95.
- Oakes, S. A., S. S. Lin, et al. (2006). "The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins." Curr Mol Med **6**(1): 99-109.
- Oakes, S. A., L. Scorrano, et al. (2005). "Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 105-10.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-8.
- Oh, K. J., S. Barbuto, et al. (2006). "A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro." J Biol Chem **281**(48): 36999-7008.
- Ohoka, N., S. Yoshii, et al. (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." Embo J **24**(6): 1243-55.
- Oltvai, Z. N., C. L. Millman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-19.
- Ozawa, T. (2001). "Ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in non-excitabile cells (Review)." Int J Mol Med **7**(1): 21-5.
- Pacher, P. and G. Hajnoczky (2001). "Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves." Embo J **20**(15): 4107-21.
- Pagliari, L. J., T. Kuwana, et al. (2005). "The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 17975-80.

- Pan, Z., M. B. Bhat, et al. (2001). "Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis." J Biol Chem **276**(34): 32257-63.
- Pardo, J., C. Urban, et al. (2006). "The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice." J Cell Biol **174**(4): 509-19.
- Parone, P. A., D. I. James, et al. (2006). "Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis." Mol Cell Biol **26**(20): 7397-408.
- Pellegrini, M., G. Belz, et al. (2003). "Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14175-80.
- Peppiatt, C. M., T. J. Collins, et al. (2003). "2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels." Cell Calcium **34**(1): 97-108.
- Perfettini, J. L., T. Roumier, et al. (2005). "Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis." Trends Cell Biol **15**(4): 179-83.
- Pimentel-Muinos, F. X. and B. Seed (1999). "Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation." Immunity **11**(6): 783-93.
- Pinton, P., D. Ferrari, et al. (2000). "Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells." J Cell Biol **148**(5): 857-62.
- Pinton, P., D. Ferrari, et al. (2001). "The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action." Embo J **20**(11): 2690-701.
- Pistor, S., T. Chakraborty, et al. (1994). "The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton." Embo J **13**(4): 758-63.
- Pizzo, P. and T. Pozzan (2007). "Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics." Trends Cell Biol **17**(10): 511-7.
- Prindull, G. (1995). "Apoptosis in the embryo and tumorigenesis." Eur J Cancer **31A**(1): 116-23.
- Putcha, G. V., S. Le, et al. (2003). "JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis." Neuron **38**(6): 899-914.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, et al. (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell **129**(7): 1337-49.

- Puthalakath, H., A. Villunger, et al. (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." Science **293**(5536): 1829-32.
- Rabizadeh, S., R. J. Xavier, et al. (2004). "The Scaffold Protein CNK1 Interacts with the Tumor Suppressor RASSF1A and Augments RASSF1A-induced Cell Death." J Biol Chem **279**(28): 29247-54.
- Rao, R. V., S. Castro-Obregon, et al. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway." J Biol Chem **277**(24): 21836-42.
- Rao, R. V., K. Niazi, et al. (2006). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell-death program: a novel HSP90-independent role for the small chaperone protein p23." Cell Death Differ **13**(3): 415-25.
- Rapizzi, E., P. Pinton, et al. (2002). "Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria." J Cell Biol **159**(4): 613-24.
- Ray, C. A., R. A. Black, et al. (1992). "Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme." Cell **69**(4): 597-604.
- Reimertz, C., D. Kogel, et al. (2003). "Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bcl-2/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway." J Cell Biol **162**(4): 587-97.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 405-13.
- Riviere, I., K. Brose, et al. (1995). "Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6733-7.
- Rizzuto, R., M. Brini, et al. (1993). "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria." Science **262**(5134): 744-7.
- Rizzuto, R., M. R. Duchen, et al. (2004). "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison." Sci STKE **2004**(215): re1.
- Rizzuto, R., P. Pinton, et al. (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses." Science **280**(5370): 1763-6.
- Rizzuto, R., P. Pinton, et al. (2003). "Calcium and apoptosis: facts and hypotheses." Oncogene **22**(53): 8619-27.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-29.
- Rong, Y. and C. W. Distelhorst (2007). "Bcl-2 Protein Family Members: Versatile Regulators of Calcium Signaling in Cell Survival and Apoptosis." Annu Rev Physiol.

- Rudner, J., A. Lepple-Wienhues, et al. (2001). "Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis." J Cell Sci **114**(Pt 23): 4161-72.
- Ruiz-Vela, A., J. T. Opferman, et al. (2005). "Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator caspases." EMBO Rep **6**(4): 379-85.
- Rusinol, A. E., Z. Cui, et al. (1994). "A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins." J Biol Chem **269**(44): 27494-502.
- Sakahira, H., M. Enari, et al. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-9.
- Saleh, M., J. C. Mathison, et al. (2006). "Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice." Nature **440**(7087): 1064-8.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." Science **275**(5302): 983-6.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." Science **300**(5616): 135-9.
- Schanne, F. A., A. B. Kane, et al. (1979). "Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway." Science **206**(4419): 700-2.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res **569**(1-2): 29-63.
- Sekine, Y., K. Takeda, et al. (2006). "The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases." Curr Mol Med **6**(1): 87-97.
- Shaffer, A. L., M. Shapiro-Shelef, et al. (2004). "XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation." Immunity **21**(1): 81-93.
- Shibue, T., S. Suzuki, et al. (2006). "Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways." Embo J **25**(20): 4952-62.
- Shimazu, T., K. Degenhardt, et al. (2007). "NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition." Genes Dev **21**(8): 929-41.
- Shinoura, N., Y. Yoshida, et al. (1999). "Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax." Oncogene **18**(41): 5703-13.

- Simonen, M., H. Keller, et al. (1997). "The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis." Eur J Biochem **249**(1): 85-91.
- Simonian, P. L., D. A. Grillo, et al. (1997). "Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2." Oncogene **15**(15): 1871-5.
- Slee, E. A., M. T. Harte, et al. (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." J Cell Biol **144**(2): 281-92.
- Song, Q., Y. Kuang, et al. (1999). "Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1." Embo J **18**(1): 167-78.
- Sriburi, R., S. Jackowski, et al. (2004). "XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **167**(1): 35-41.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1998). "Properties of the caspases." Biochim Biophys Acta **1387**(1-2): 17-31.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.
- Su, J., G. Wang, et al. (2006). "Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria." J Virol **80**(3): 1140-51.
- Subramanian, K. and T. Meyer (1997). "Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores." Cell **89**(6): 963-71.
- Subramanian, T. and G. Chinnadurai (2003). "Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK." J Cell Biochem **89**(6): 1102-14.
- Sun, Y. F., L. Y. Yu, et al. (2003). "Mutational analysis of N-Bak reveals different structural requirements for antiapoptotic activity in neurons and proapoptotic activity in nonneuronal cells." Mol Cell Neurosci **23**(1): 134-43.
- Sun, Y. F., L. Y. Yu, et al. (2001). "Neuron-specific Bcl-2 homology 3 domain-only splice variant of Bak is anti-apoptotic in neurons, but pro-apoptotic in non-neuronal cells." J Biol Chem **276**(19): 16240-7.
- Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-54.
- Szabadkai, G., K. Bianchi, et al. (2006). "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels." J Cell Biol **175**(6): 901-11.
- Szalai, G., R. Krishnamurthy, et al. (1999). "Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals." Embo J **18**(22): 6349-61.
- Szegezdi, E., U. Fitzgerald, et al. (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." Ann N Y Acad Sci **1010**: 186-94.

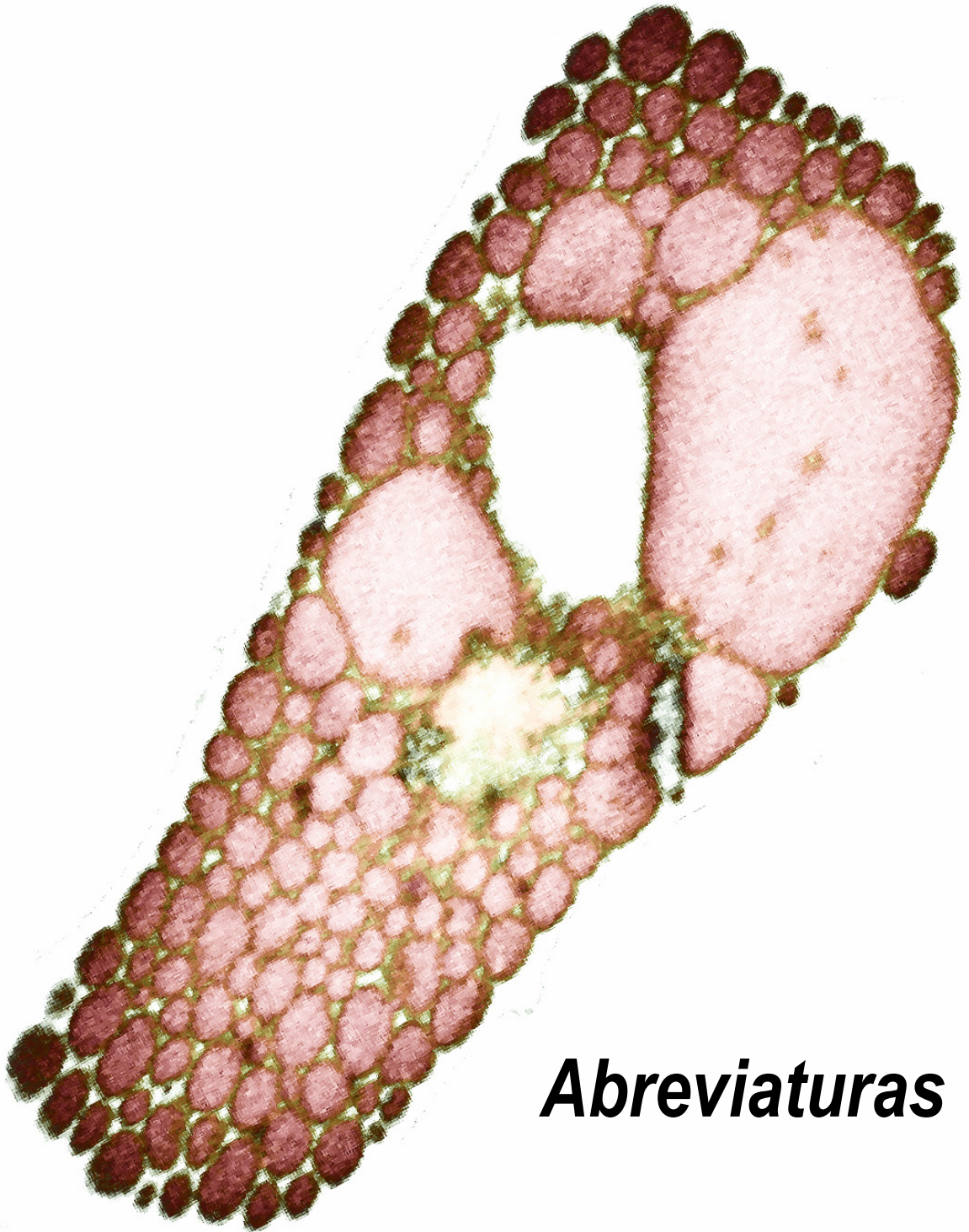
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-5.
- Takeuchi, O., J. Fisher, et al. (2005). "Essential role of BAX,BAK in B cell homeostasis and prevention of autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11272-7.
- Theodorakis, P., E. Lomonosova, et al. (2002). "Critical requirement of BAX for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells." Cancer Res **62**(12): 3373-6.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Timmer, J. C. and G. S. Salvesen (2007). "Caspase substrates." Cell Death Differ **14**(1): 66-72.
- Tomiyama, A., S. Serizawa, et al. (2006). "Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak." J Natl Cancer Inst **98**(20): 1462-73.
- Torgler, C. N., M. de Tiani, et al. (1997). "Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1." Cell Death Differ **4**(4): 263-71.
- Tournier, C., P. Hess, et al. (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-4.
- Treiman, M., C. Caspersen, et al. (1998). "A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases." Trends Pharmacol Sci **19**(4): 131-5.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, et al. (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2007). "Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death." Apoptosis **12**(5): 835-40.
- U, M., T. Miyashita, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family." FEBS Lett **509**(1): 135-41.
- Uo, T., Y. Kinoshita, et al. (2005). "Neurons exclusively express N-Bak, a BH3 domain-only Bak isoform that promotes neuronal apoptosis." J Biol Chem **280**(10): 9065-73.
- Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**(5453): 664-6.
- Uren, R. T., G. Dewson, et al. (2007). "Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak." J Cell Biol **177**(2): 277-87.
- Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." Anat Histol Embryol **31**(4): 214-23.
- van Gurp, M., N. Festjens, et al. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 487-97.

- Vance, J. E. (2003). "Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **75**: 69-111.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Villunger, A., E. M. Michalak, et al. (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa." Science **302**(5647): 1036-8.
- Voeltz, G. K., M. M. Rolls, et al. (2002). "Structural organization of the endoplasmic reticulum." EMBO Rep **3**(10): 944-50.
- Walensky, L. D., K. Pitter, et al. (2006). "A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX." Mol Cell **24**(2): 199-210.
- Walter, L. and G. Hajnoczky (2005). "Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk." J Bioenerg Biomembr **37**(3): 191-206.
- Wang, G. Q., B. R. Gastman, et al. (2001). "A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs." J Biol Chem **276**(36): 34307-17.
- Wang, G. Q., E. Wieckowski, et al. (2001). "Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells." J Exp Med **194**(9): 1325-37.
- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." Genes Dev **10**(22): 2859-69.
- Wasiak, S., R. Zunino, et al. (2007). "Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death." J Cell Biol **177**(3): 439-50.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**(16): 2060-71.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.
- Weller, M., U. Malipiero, et al. (1995). "T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor-beta 2: modulation by the phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A." Exp Cell Res **221**(2): 395-403.
- Weston, C. R. and R. J. Davis (2007). "The JNK signal transduction pathway." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 142-9.
- Westphalen, B. C., J. Wessig, et al. (2005). "BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum." Cell Death Differ **12**(3): 304-6.
- White, C., C. Li, et al. (2005). "The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R." Nat Cell Biol **7**(10): 1021-8.
- White, E. (2006). "Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis." Cell Death Differ **13**(8): 1371-7.

- Willis, S. N. and J. M. Adams (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 617-25.
- Willis, S. N., L. Chen, et al. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." Genes Dev **19**(11): 1294-305.
- Willis, S. N., J. I. Fletcher, et al. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." Science **315**(5813): 856-9.
- Wolf, B. B. and D. R. Green (1999). "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases." J Biol Chem **274**(29): 20049-52.
- Woo, M., R. Hakem, et al. (1998). "Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes." Genes Dev **12**(6): 806-19.
- Wu, J. and R. J. Kaufman (2006). "From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response." Cell Death Differ **13**(3): 374-84.
- Xu, C., W. Xu, et al. (2008). "BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis downstream of Bcl-2-family proteins." J Biol Chem.
- Xu, Q. and J. C. Reed (1998). "Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast." Mol Cell **1**(3): 337-46.
- Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2002). "Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL." J Biol Chem **277**(44): 41604-12.
- Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." J Biol Chem **279**(44): 45495-502.
- Yamasaki, E., A. Wada, et al. (2006). "Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation." J Biol Chem **281**(16): 11250-9.
- Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." Cell **80**(2): 285-91.
- Yang, T., K. M. Kozopas, et al. (1995). "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2." J Cell Biol **128**(6): 1173-84.
- Yasuda, M., P. Theodorakis, et al. (1998). "Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence." J Biol Chem **273**(20): 12415-21.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, et al. (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." J Biol Chem **276**(17): 13935-40.

- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-91.
- Yoshida, T., T. Shiraishi, et al. (2005). "Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein." Cancer Res **65**(13): 5662-7.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Yu, J., Z. Wang, et al. (2003). "PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1931-6.
- Yu, J., L. Zhang, et al. (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." Mol Cell **7**(3): 673-82.
- Yuan, J., S. Shaham, et al. (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." Cell **75**(4): 641-52.
- Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 67-71.
- Zeng, Y. S. and Z. C. Xu (2000). "Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia." Neurosci Res **37**(2): 113-25.
- Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell **87**(4): 619-28.
- Zhai, D., C. Jin, et al. (2008). "Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2-family proteins, Bcl-B and Mcl-1." J Biol Chem.
- Zhang, L., J. Yu, et al. (2000). "Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents." Science **290**(5493): 989-92.
- Zhao, F., P. Li, et al. (2001). "Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity." J Biol Chem **276**(17): 13810-6.
- Zheng, T. S., S. Hunot, et al. (2000). "Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation." Nat Med **6**(11): 1241-7.
- Zhou, Q., J. F. Krebs, et al. (1998). "Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex." Biochemistry **37**(30): 10757-65.
- Zhu, L., S. Ling, et al. (1999). "Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2." J Biol Chem **274**(47): 33267-73.
- Zhu, W., A. Cowie, et al. (1996). "Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types." Embo J **15**(16): 4130-41.
- Zhu, Y., B. J. Swanson, et al. (2004). "Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7681-6.

- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.
- Zinszner, H., M. Kuroda, et al. (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev **12**(7): 982-95.
- Zong, W. X., C. Li, et al. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol **162**(1): 59-69.
- Zong, W. X., T. Lindsten, et al. (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): 1481-6.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.



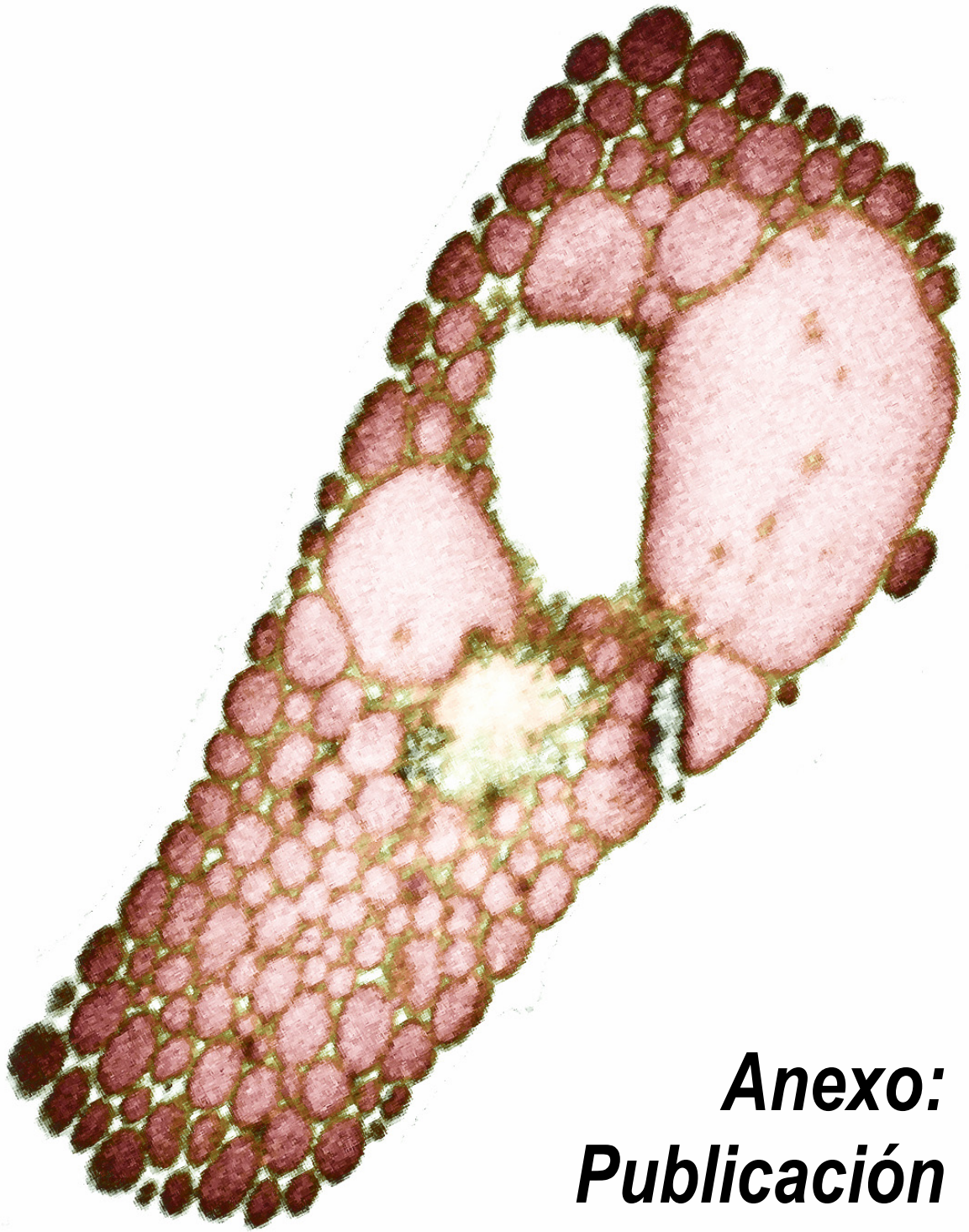
Abreviaturas

2-APB	del inglés <i>2-aminoethyl diphenylborinate</i>
aa	aminoácido
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIF	factor inductor de apoptosis, del inglés <i>apoptosis inducing factor</i>
AM	acetoximetil éster
Apaf-1	del inglés <i>apoptosis protease activating factor 1</i>
ARN	ácido ribonucleico
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ASK1	del inglés <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
Asp	ácido aspártico
ATF6	factor activador de la transcripción 6, del inglés <i>activating transcription factor 6</i>
ATP	adenosín trifosfato, del inglés <i>adenosine triphosphate</i>
Bak	del inglés <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	del inglés <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	del inglés <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X_L	del inglés <i>Bcl-X long</i>
BH	del inglés <i>Bcl-2 homology domain</i>
BrEt	bromuro de etidio
BSA	albúmina sérica bovina, del inglés <i>bovine serum albumin</i>
CaM	calmodulina
CARD	dominios de reclutamiento y activación de caspasas, del inglés <i>caspase activation and recruitment domain</i>
cb5	citocromo b5
CFP	del inglés <i>cyan fluorescent protein</i>
cm	centímetro
CrmA	del inglés <i>cytokine-response modifier A</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, del inglés <i>4',6' diamidino-2-phenylindole</i>
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato, del inglés <i>deoxyadenosine triphosphate</i>
DD	dominio de muerte, del inglés <i>death domain</i>
DED	dominio efector de muerte, del inglés <i>death effector domain</i>
DISC	del inglés <i>death-inducing signalling complex</i>
DKO	del inglés <i>double-knockout</i>

DMEM	del inglés <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DN	dominante negativo
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato, del inglés <i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DTT	ditiotreitol
EBV	del inglés <i>Ebstein Barr virus</i>
ECL	del inglés <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	etilendiaminotetraacetato
EGTA	etilénglicol-bis(β-aminoetileter)N,N,N',N, tetraacético
ERAD	degradación de proteínas asociada al RE, del inglés <i>ER-associated protein degradation</i>
FACS	citometría de flujo, del inglés <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FasL	del inglés <i>Fas-ligand</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína, del inglés <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	transferencia de energía entre fluorocromos, del inglés <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	proteína fluorescente verde, del inglés <i>green fluorescent protein</i>
HA	hemaglutinina
HBSS	del inglés <i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK-293T	células de riñón embrionario humano, del inglés <i>human embryonic kidney-293T cells</i>
HeLa	células de adenocarcinoma de cérvix de Henrietta Lacks
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
HRP	peroxidasa de rábano, del inglés <i>horseradish peroxidase</i>
IAP	proteínas inhibidoras de la apoptosis, del inglés <i>inhibitors of apoptosis</i>
IF	inmunofluorescencia
Ig	inmunoglobulina
IP	ioduro de propidio
IP₃R	receptores de trifosfato de inositol, del inglés <i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor</i>
IRE1	del inglés <i>inositol-requiring protein 1</i>
IRES	sitio de entrada interno ribosomal, del inglés <i>internal ribosome entry site</i>
JNK	quinasas del dominio amino terminal de c-Jun, del inglés <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LTR	repeticiones terminales largas, del inglés <i>long terminal repeats</i>
M	molar
MEF	fibroblastos embrionarios murinos, del inglés <i>mouse embryonic fibroblasts</i>

mg	<u>m</u> iligramos
mGFP	GFP mitocondrial, del inglés <u>m</u> itochondrial <u>GFP</u>
min	<u>m</u> inuto
ml	<u>m</u> ililitro
mm	<u>m</u> ilímetro
mM	<u>m</u> ilimolar
MOM	del inglés <u>m</u> itochondrial <u>o</u> uter <u>m</u> embrane
mRFP	RFP mitocondrial, del inglés <u>m</u> itochondrial <u>RFP</u>
N-	amino-
NF-κB	factor nuclear-κB, del inglés <u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> appa <u>B</u>
ng	<u>n</u> anogramo
ORF	fase de lectura abierta, del inglés <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida, del inglés <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PARP	<u>p</u> oli- <u>A</u> DP- <u>r</u> ibosa <u>p</u> olimerasa
pb	<u>p</u> ares de <u>b</u> ases
Pb	<u>p</u> olibreno
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PERK	del inglés <u>P</u> KR-like <u>E</u> R <u>k</u> inase
pH	log 1/[H ⁺]
pmol	<u>p</u> icomol
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés <u>p</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulphonyl <u>f</u> luoride
PT	del inglés <u>p</u> ermeability <u>t</u> ransition
PTP	<u>p</u> oro de <u>t</u> ransición de <u>p</u> ermeabilidad
Puma	del inglés <u>p</u> 35- <u>u</u> pregulated <u>m</u> odulator of <u>a</u> ptosis
Puro	<u>p</u> uromicina
PVDF	difluoruro de polivinilo, del inglés <u>p</u> oly <u>v</u> inylidene <u>d</u> ifluoride
RE	<u>r</u> etículo <u>e</u> ndoplasmático
reGFP	GFP reticular, del inglés <u>r</u> eticular <u>GFP</u>
reRFP	RFP reticular, del inglés <u>r</u> eticular <u>RFP</u>
RFP	proteína fluorescente roja, del inglés <u>r</u> ed <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
rpm	<u>r</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
RyR	receptor de rianodina, del inglés <u>r</u> yanodine <u>r</u> eceptor
SDS	dodecilsulfato sódico, del inglés <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SERCA	del inglés <u>s</u> arcoplasmic or <u>e</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum <u>C</u> a ²⁺ <u>A</u> TPase
SFB	suero fetal <u>b</u> ovino

Smac/DIABLO	del inglés <i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>
STS	staurosporina
SV-40	del inglés <i>Simian Vacuolating Virus 40</i>
TAE	del inglés <i>Tris-Acetate-EDTA</i>
tBid	Bid truncado, del inglés <i>truncated Bid</i>
TBS	tampón Tris salino, del inglés <i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris EDTA
TG	del inglés <i>thapsigargin</i>
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral, del inglés <i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRAF2	del inglés <i>TNF receptor associated factor2</i>
TRIS	hidroximetil aminometano, del inglés <i>trishydroxymethylaminomethane</i>
U	unidad
UPR	respuesta de proteínas desplegadas, del inglés <i>unfolded protein response</i>
UV	luz ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen/volumen
VDAC	del inglés <i>voltage dependent anion-selective channel</i>
VSV	del inglés <i>vesicular stomatitis virus G protein</i>
WB	del inglés <i>western blot</i>
wt	fenotipo silvestre, del inglés <i>wild-type</i>
XBP-1	del inglés <i>X-box binding protein 1</i>
YC3.3	del inglés <i>yellow cameleon 3.3</i>
YFP	del inglés <i>yellow fluorescent protein</i>
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar



***Anexo:
Publicación***

Bcl-X_L specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum

Martina Klee and Felipe X. Pimentel-Muñoz

Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, 37007 Spain

Bcl-2 family members Bak and Bax constitute a mitochondrial gateway for multiple death pathways. Both proteins are also present in the endoplasmic reticulum where they control apoptosis through the regulation of calcium levels. We show here that reticular Bak has the additional capacity of modulating the structure of this organelle. Coexpression of Bak and Bcl-X_L provokes extensive swelling and vacuolization of reticular cisternae. A Bak version lacking the BH3 domain suffices to induce this phenotype, and reticular targeting of this mutant retains the activity. Expression of upstream BH3-

only activators in similar conditions recapitulates ER swelling and vacuolization if ryanodine receptor calcium channel activity is inhibited. Experiments with Bak and Bax-deficient mouse embryonic fibroblasts show that endogenous Bak mediates the effect, whereas Bax is mainly irrelevant. These results reveal a previously unidentified role of Bak in regulating reticular conformation. Because this activity is absent in Bax, it constitutes one of the first examples of functional divergence between the two multidomain homologues.

Introduction

Apoptotic cell death ensures the elimination of cells that become irrelevant or potentially damaging for the organism (Danial and Korsmeyer, 2004), and the Bcl-2 family of proteins plays a central role in the regulation of this process (Adams and Cory, 1998). This family includes both pro- and anti-apoptotic molecules sharing homology in any of the four Bcl-2 homology (BH) domains identified so far (BH1 to 4; Adams and Cory, 1998). The role of Bcl-2 proteins in the regulation of mitochondrial apoptosis has been clearly established (Green and Reed, 1998). However, functions in other subcellular compartments, like the ER, are beginning to be discovered (Breckenridge et al., 2003).

Based on both structural and functional criteria, three subgroups of Bcl-2 homologues have been identified. One of them includes pro-apoptotic effectors like Bak and Bax, characterized by containing three of the prototypical BH domains (BH1, BH2, and BH3; Adams and Cory, 1998; Reed, 1998). A functional BH3 domain has been shown to be critical for the apoptotic activity of these proteins (Chittenden et al., 1995a; Simonen et al., 1997). A second subgroup contains pro-apoptotic molecules structurally related by the presence of only one family domain corresponding to BH3. Members of this

subfamily are thus known as BH3-only proteins (Bouillet and Strasser, 2002). The third subgroup includes anti-apoptotic homologues like Bcl-2 and Bcl-X_L, and a distinct structural feature is the presence of a BH4 domain in addition to BH domains 1, 2, and 3 (Adams and Cory, 1998; Reed, 1998). Bcl-2 family proteins have a propensity to dimerize, and the fine balance between pro- and anti-apoptotic members often defines whether a cell will survive or will commit to death in response to a particular insult (Reed, 1998; Danial and Korsmeyer, 2004).

Current knowledge about apoptotic signaling cascades supports the view that BH3-only molecules initiate the pathway, activating downstream effectors Bak and Bax to trigger mitochondrial apoptosis (Bouillet and Strasser, 2002). According to this model, apoptotic insults unleash BH3-only homologues and induce their translocation to the outer mitochondrial membrane (Bouillet and Strasser, 2002). Once in the mitochondria, these proteins are thought to bind preferentially anti-apoptotic members of the family (Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001; Letai et al., 2002), saturating protective binding sites before they bind and activate Bak and Bax. This direct engagement of Bak and Bax has been established for BH3-only members BimEL and Bid (Desagher et al., 1999; Wei et al., 2000; Letai et al., 2002). Other homologues, like Bik or Bad, bind anti-apoptotic molecules only, thus exerting a sensitization effect (Letai et al., 2002). Activation of Bak and Bax involves modifications in their conformation (Hsu and Youle, 1997; Desagher et al., 1999; Griffiths et al., 1999) and assembly into oligomers

Correspondence to F.X. Pimentel-Muñoz: fxp@usal.es

Abbreviations used in this paper: BH, Bcl-2 homology; erRFP, ER-targeted RFP; FRET, fluorescence resonance energy transfer; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; RyR, ryanodine receptor; tBid, truncated version of Bid.

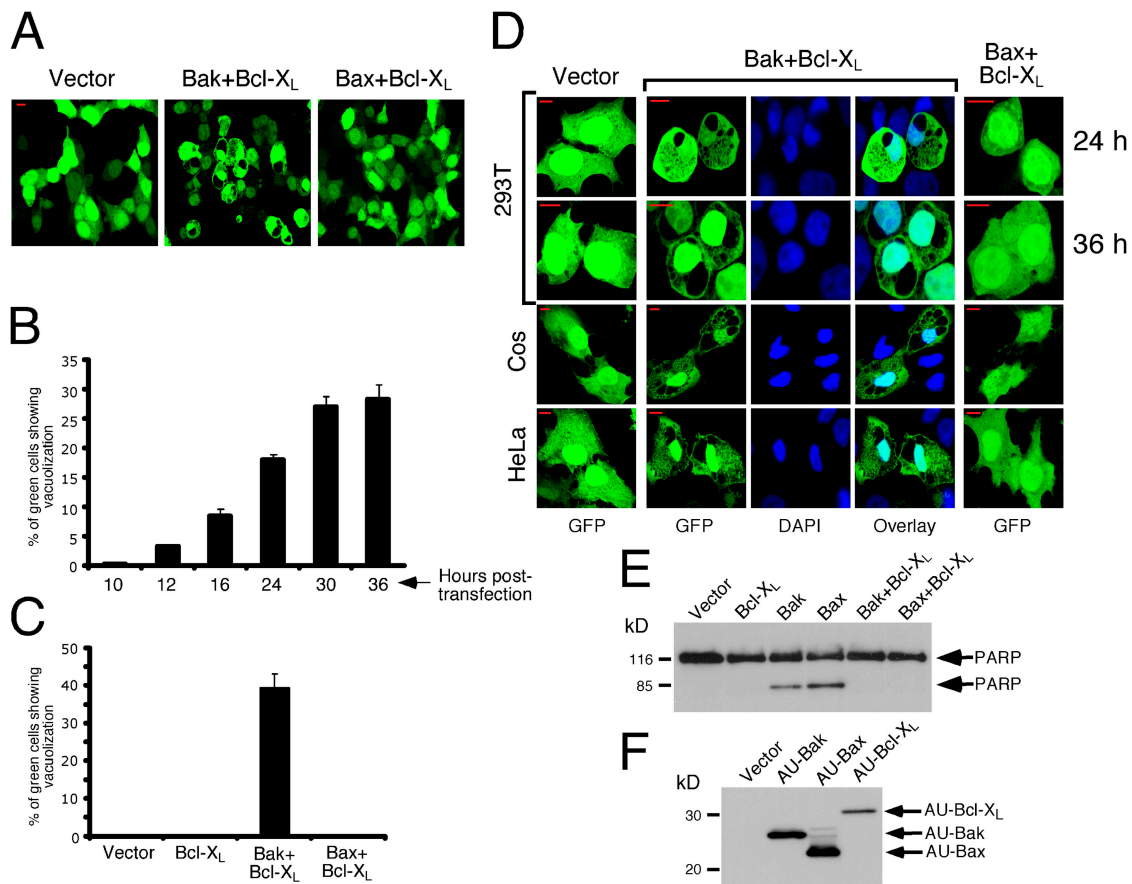


Figure 1. Coexpression of Bak and Bcl-X_L induces cytoplasmic vacuolization. (A) Confocal analysis of cytoplasmic vacuolization induced by coexpression of Bak and Bcl-X_L. 293T cells were transfected with a mix of the indicated expression plasmids in combination with a plasmid expressing cytosolic GFP. 36 h after transfection, cells were fixed, mounted, and analyzed by confocal microscopy. (B) Time course of vacuolization induced by coexpression of Bak and Bcl-X_L. 293T cells were cotransfected with Bak, Bcl-X_L, and GFP as in A. At the indicated time points the proportion of GFP-expressing cells showing a detectable level of cytoplasmic vacuolization was determined *in vivo* by blindly counting green cells under an inverted fluorescence microscope. At least 400 cells were scored for each experimental point. Columns represent the percentage of GFP-expressing cells showing a vacuolated cytoplasm. Error bars show SDs of percentages obtained by counting at least eight different fields. (C) Quantitation of cells showing cytoplasmic vacuolization after transfection with Bak or Bax in combination with Bcl-X_L. 293T cells were transfected as in A, and analyzed as in B, 36 h after transfection. (D) Confocal analysis of cytoplasmic vacuolization induced by Bak and Bcl-X_L in different cell types. The indicated cells were transfected with the same mix of plasmids as in A. 24 h (293T, as indicated) or 36 h (293T, HeLa, and Cos) later, cells were fixed, stained with DAPI, and mounted for confocal analysis. (E) Bcl-X_L inhibits Bak and Bax-induced apoptosis to the same extent. 293T cells were transfected with the indicated expression plasmids. 24 h after transfection, cells were lysed and equal amounts of proteins were subjected to Western blotting using an anti-PARP antibody. (F) AU-Bak and AU-Bax are expressed to comparable levels. 293T cells were transfected as in E with the exception that a vector expressing the viral caspase inhibitor p35 was introduced in all experimental points to block death. 24 h after transfection, cells were lysed and equal amounts of proteins were resolved by PAGE and blotted with an anti-AU mAb.

(Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000). These changes ultimately result in the release of mitochondrial apoptogenic factors into the cytoplasm, thus irreversibly launching the death process (Green and Reed, 1998; Danial and Korsmeyer, 2004).

Recently, Bak and Bax were shown to be essential for multiple apoptotic pathways (Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001; Zong et al., 2001). In addition, both effectors show a substantial functional redundancy because cells deficient in only one of them remain sensitive to a variety of apoptotic stimuli. Consistent with this, mice deficient in either protein show mild phenotypes (Knudson et al., 1995; Lindsten et al., 2000), whereas animals deficient in both of them suffer major abnormalities (Lindsten et al., 2000). However, specific roles for Bak and Bax can be found in the literature. Some publications refer to a more prominent involvement of Bax in multiple cell death pathways in human cells (Zhang et al., 2000; The-

odorakis et al., 2002; Gillissen et al., 2003), whereas other reports describe a fundamental role for Bak in cell death induced by anticancer drugs (Wang et al., 2001a) or granzyme B (Wang et al., 2001b). Additional differences relate to their subcellular localization. In healthy cells, Bax is mainly a soluble protein (Suzuki et al., 2000) that stably associates with intracellular membranes upon an apoptotic insult (Hsu et al., 1997). On the contrary, Bak is permanently inserted into subcellular membranes and does not change its localization during apoptosis (Griffiths et al., 1999). Although these differences could reflect a differential regulation of pathways common to Bak and Bax, they may also suggest the existence of biological activities exclusively performed by each one of these molecules, which, for the most part, have not been described.

Both Bak and Bax are also localized in the ER (Nutt et al., 2002; Zong et al., 2003), an organelle that constitutes one

of the main calcium storages in the cell (Rizzuto et al., 2003). In fact, these effectors partially control apoptosis by regulating ER calcium levels (Breckenridge et al., 2003; Rizzuto et al., 2003). For example, Bak and Bax-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) show a reduced ER calcium concentration and a concomitant decreased response to apoptotic stimuli that use ER calcium for intracellular signaling (Scorrano et al., 2003). In turn, Bak and Bax expression promotes calcium release from ER stores thus leading to cell death (Nutt et al., 2002; Zong et al., 2003). Therefore, like in mitochondria, activities ascribed so far to Bak and Bax in the ER seem quite overlapping. In any event, the role of Bcl-2-family members in reticular cisternae has only recently been addressed, and the full scope of their functions in this compartment is probably far from complete.

Here, we describe a novel activity of Bak in the ER. When coexpressed with Bcl-X_L, Bak is able to induce dramatic conformational alterations and swelling of reticular cisternae. Due to an inhibitory function performed by ryanodine receptor (RyR) calcium channels, this phenomenon remains undetected if the signaling pathway is stimulated by upstream BH3-only activators. However, blockade of RyR activity by pharmacological agents reveals this underlying activity as a profuse ER swelling and vacuolization whose induction requires the endogenous expression of Bak. Interestingly, we find that Bax completely lacks this potential, indicating that the two multidomain homologues may not always carry out a completely overlapping range of cellular activities.

Results

Previous reports indicate that the enforced expression of Bak and Bax triggers spontaneous cell death (Chittenden et al., 1995b; Xiang et al., 1996), an activity opposed by anti-apoptotic homologues like Bcl-X_L (Chittenden et al., 1995a; Simonen et al., 1997). To look for functional differences between Bak and Bax we took advantage of this overexpression approach, and transfected both molecules under various conditions into 293T cells. A striking difference arose when the induced apoptotic process was inhibited by Bcl-X_L. Simultaneous expression of Bak and Bcl-X_L provoked a prominent cytoplasmic vacuolization revealed by the exclusion of cytosolic GFP (Fig. 1 A), whereas this phenotype was absent in cells coexpressing Bax and Bcl-X_L (Fig. 1 A). Time course experiments showed that the effect was first detectable between 12 and 16 h after transfection (Fig. 1 B), peaking at around 36 h after transfection (Fig. 1 B). At this time point there was no detectable vacuolization in cells transfected with Bax in the presence of Bcl-X_L, Bcl-X_L alone, or empty vector (Fig. 1 C). At later times cells lost viability as evidenced by an increased permeability to propidium iodide (unpublished data), a death process that progressed without detectable caspase-dependent proteolytic processing of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; unpublished data). This vacuolating capacity of Bak and Bcl-X_L was independent of the cell type, because different cell lines were similarly susceptible (Fig. 1 D). DNA staining with DAPI showed that at least one prominent cytoplasmic vacuole was

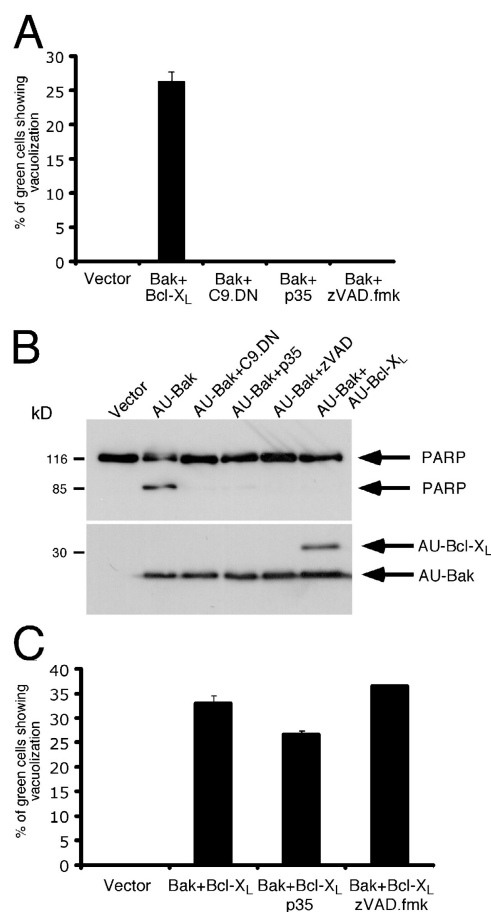


Figure 2. Inhibition of Bak-induced apoptosis is not sufficient to reveal cytoplasmic vacuolization. (A) Quantitation of vacuolated cells after transfection with Bak in the presence of different apoptotic inhibitors. 293T cells were transfected with a mix of the indicated plasmids and a GFP-expressing plasmid. C9.DN and p35 denote a dominant-negative version of caspase-9 and the viral caspase inhibitor p35, respectively. When indicated, the pan-caspase inhibitor zVAD.fmk (100 μ M) was added 1 h after transfection. Cytoplasmic vacuolization was scored as in Fig. 1 B. (B) Death inhibitors unable to reveal vacuolization block Bak apoptosis to the same extent as Bcl-X_L. 293T cells were transfected with a mix of the indicated expression plasmids. Z-VAD.fmk (100 μ M) was added 1 h after transfection. Cells were lysed 24 h after transfection. Shown are blots probed with anti-PARP (top) and anti-AU (bottom) antibodies. The latter confirms equal transfection efficiency. (C) Quantitation of cells showing cytoplasmic vacuolization after transfection with Bak and Bcl-X_L in the presence of different inhibitors of apoptosis. 293T cells were transfected and treated as in A, and scored as in Fig. 1 B.

usually localized in close contact with the periphery of the nucleus (Fig. 1 D). The different potential of transfected Bak and Bax in this assay was not due to a dissimilar inhibitory capability of Bcl-X_L, because the proteolytic processing of PARP was equally blocked by Bcl-X_L in both cases (Fig. 1 E). In addition, no significant differences in Bak and Bax expression levels could account for the observed phenomena (Fig. 1 F).

Because Bak overexpression triggers efficient death (Fig. 1 E; Chittenden et al., 1995b), it is possible that the generation of cytoplasmic vacuolae is a simultaneous phenomenon normally obscured by the dominant apoptotic activity. In this scenario, cotransfected Bcl-X_L would reveal the phenotype by simply inhibiting cell death. A prediction of this model is that

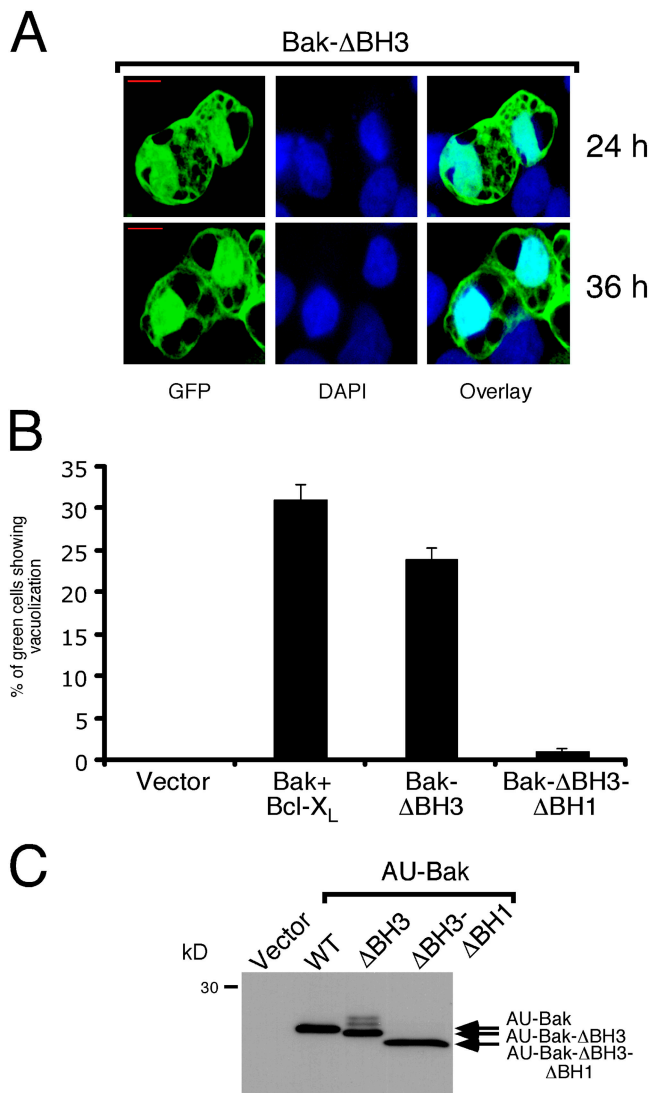


Figure 3. A version of Bak lacking the BH3 domain induces cytoplasmic vacuolization in the absence of cotransfected Bcl-X_L. (A) Confocal analysis of cytoplasmic vacuolization induced by expression of Bak-ΔBH3. 293T cells were transfected with a mix of plasmids expressing Bak-ΔBH3 and GFP. Cells were fixed, mounted, and analyzed by confocal microscopy 24 or 36 h (as indicated) after transfection. (B) Quantitation of vacuolization in cells transfected with Bak-ΔBH3 or Bak-ΔBH3-ΔBH1. 293T cells were transfected with the indicated plasmids, along with a GFP-expressing plasmid. 36 h later the proportion of GFP-expressing cells showing vacuolization was determined as in Fig. 1 B. (C) AU-Bak, AU-Bak-ΔBH3, and AU-Bak-ΔBH3-ΔBH1 are expressed to comparable levels. 293T cells were transfected, lysed, and processed as in Fig. 1 F. Shown is a Western blot probed with an anti-AU antibody.

Bak expression should induce vacuolization in the presence of alternative blockers of apoptosis. However, treatment with different caspase inhibitors was not sufficient to reveal the phenotype in Bak-transfected cells (Fig. 2 A), although all tested reagents suppressed PARP processing to the same extent as Bcl-X_L did (Fig. 2 B). While this result could also indicate that caspases are necessary for vacuolization, caspase inhibition during coexpression of Bak and Bcl-X_L did not reduce the proportion of vacuolated cells (Fig. 2 C), ruling out a role for these proteases in the observed phenomenon. Together, these data

show that Bak normally lacks the capability of inducing cytoplasmic vacuolization, and suggest the need for an activation step provided by Bcl-X_L. Alternatively, Bcl-X_L, and not Bak, could be the effector molecule in this context.

Bcl-X_L has been shown to bind and inhibit Bak and Bax BH3 domains, thus antagonizing their apoptotic activities (Chittenden et al., 1995a; Simonen et al., 1997). Therefore, the capacity of Bcl-X_L to reveal the vacuolating potential of Bak might as well involve BH3 domain inhibition. To test this possibility, we created a deleted version of Bak lacking the BH3 domain (Bak-ΔBH3) and evaluated its ability to induce the observed phenomenon in the absence of Bcl-X_L. Transfection experiments indicated that this Bak mutant has an autonomous ability to induce cytoplasmic vacuolization (Fig. 3 A). Quantitation studies showed only a slight decrease in the percentage of vacuolated cells compared with cultures transfected with Bak and Bcl-X_L (Fig. 3 B). Both Bak versions were expressed to similar levels (Fig. 3 C). These data confirm that Bak, and not Bcl-X_L, is the active molecule in this context, and suggest that Bcl-X_L reveals this function by binding and inactivating the BH3 domain of Bak.

Interestingly, additional deletion of the BH1 domain blocked the vacuolating activity of Bak-ΔBH3 (Fig. 3 B) without affecting its expression level (Fig. 3 C) or intracellular distribution (unpublished data). This result suggests a role for Bak BH1 domain in inducing the phenotype. In addition, because both Bak versions (Bak-ΔBH3 and Bak-ΔBH3-ΔBH1) provoked a comparable loss of cell viability at late time points (measured by propidium iodide permeability; unpublished data), cytoplasmic vacuolization is probably not an epiphenomenon linked to this delayed death.

ER swelling is a morphological change associated with multiple cell death modalities (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002). To determine if vacuolae were topologically related to reticular cisternae, we created a version of RFP targeted to the ER lumen (erRFP). Control experiments established that erRFP completely colocalized with the ER marker calreticulin in normal cells (Fig. 4 A). Transfection of Bak in the presence of Bcl-X_L, or Bak-ΔBH3 alone, in combination with this construct showed that the induced vacuolae were completely filled with erRFP, clearly establishing their reticular origin (Fig. 4 B). A substantial fraction of the ER remained unchanged at early stages of the swelling process (Fig. 4 B, 293T cells, 24 h), but reticular cisternae seemed to be progressively incorporated into the altered structures as transfection evolved (Fig. 4 B). These results reveal the potential of Bak to regulate ER structure. Because vacuolae can often occupy a substantial area of the cell, their generation likely involves a swelling process, although some contribution of ER tubulae fusion cannot be ruled out.

To determine the subcellular localization of transfected Bak with respect to dilated ER cisternae we used AU-tagged versions of the different molecules. Anti-AU immunofluorescence stainings of cells transfected with AU-Bak in combination with untagged Bcl-X_L, or AU-Bak-ΔBH3 alone, revealed that vacuolae were often coated with a punctated pattern of AU reactivity (Fig. 5 A). This was particularly obvious in areas of

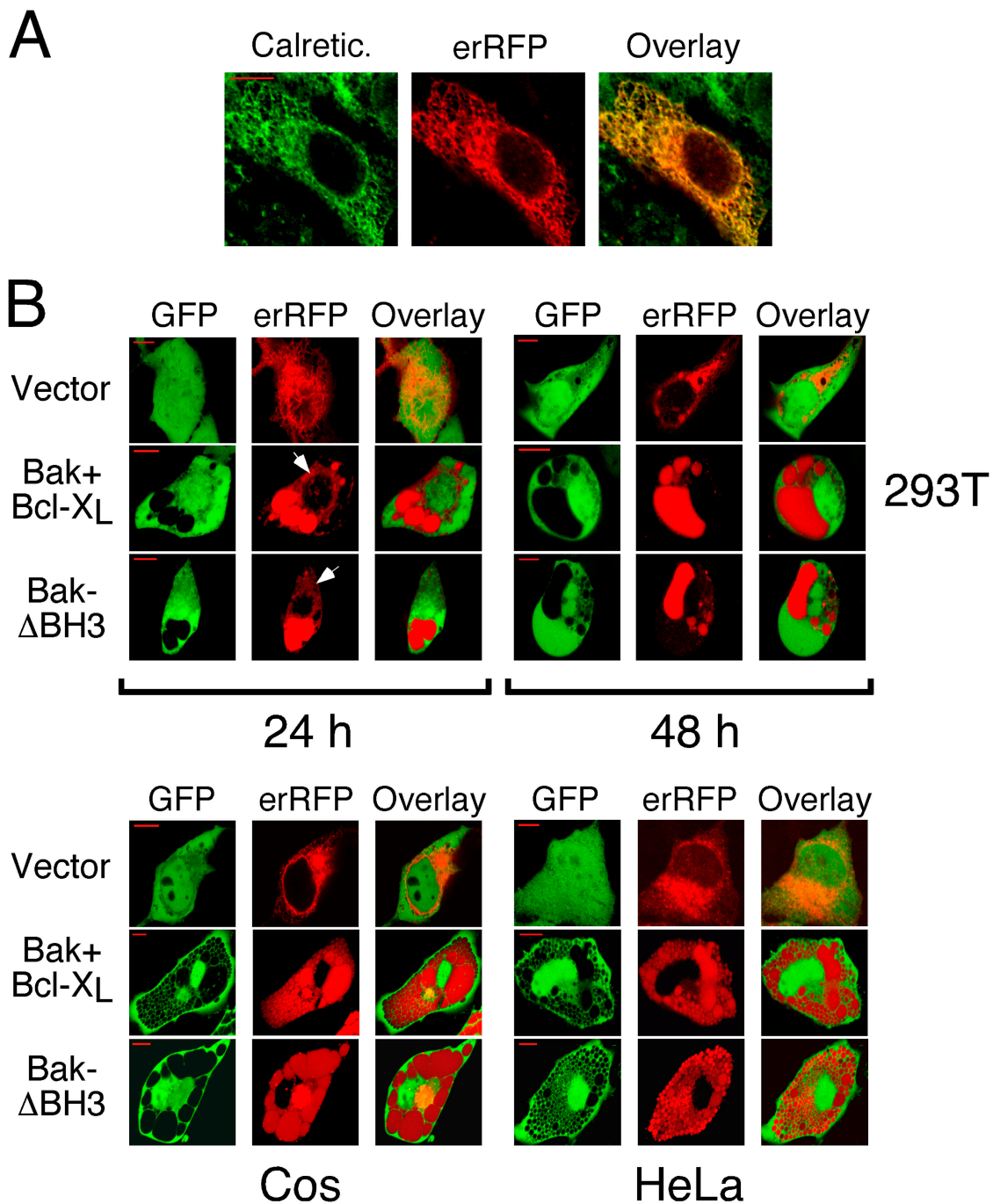


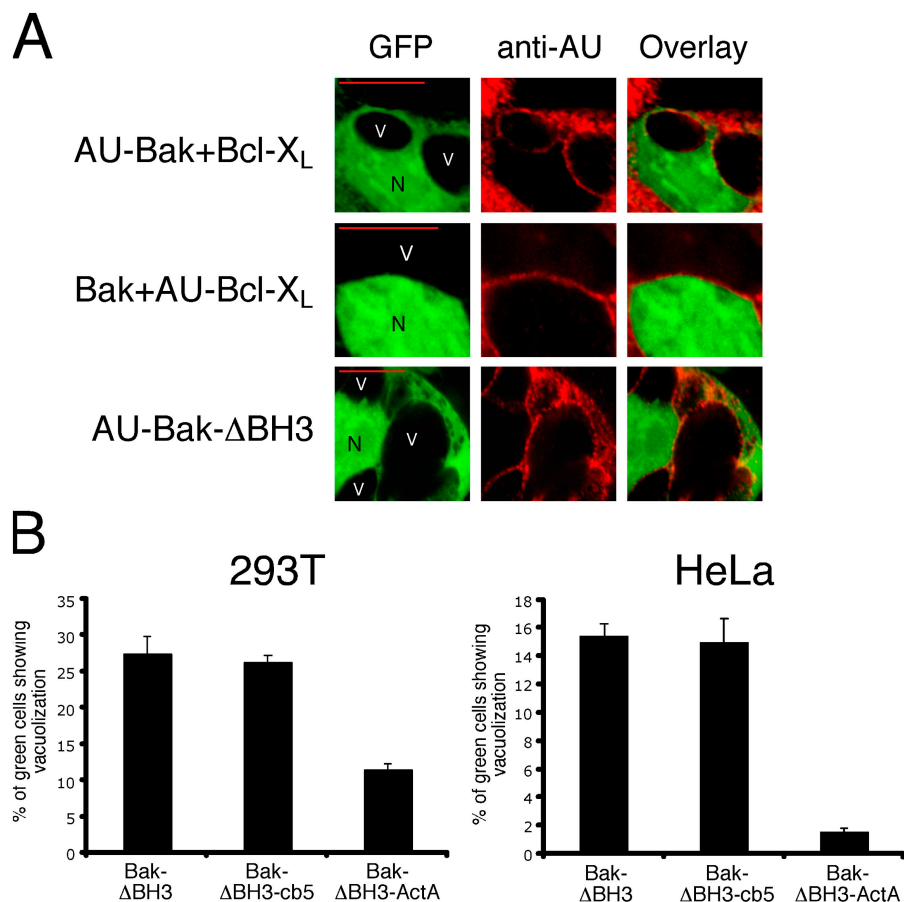
Figure 4. Cytoplasmic vacuolae are swollen ER cisternae. (A) Colocalization of erRFP with endogenous calreticulin. 293T cells were transfected with a plasmid encoding ER-targeted RFP (erRFP). 48 h later cells were fixed and stained with an anti-calreticulin antibody followed by an Alexa 488 (green)-coupled antibody, and analyzed by confocal microscopy. Shown is one representative example. (B) Vacuolae induced by transfection of Bak and Bcl-X_L or Bak-ΔBH3, are filled with coexpressed erRFP. 293T, Cos, and HeLa cells were cotransfected with the indicated constructs and plasmids expressing GFP and erRFP. 24 h (293T cells, as indicated), or 48 h after transfection, cells were analyzed *in vivo* by confocal microscopy. Live cells were used since fixation resulted in the disappearance of erRFP fluorescence from vacuolae in mounted preparations. White arrows indicate reticular cisternae that remain unaffected at early time points in 293T cells.

direct apposition with the nucleus (Fig. 5 A). A variation of the same experiment showed a similar distribution of Bcl-X_L (Fig. 5 A). These results indicate the existence of a topological link between effector molecules and swollen cisternae.

This idea was also supported by experiments where we artificially targeted Bak-ΔBH3 to different subcellular com-

partments. A chimeric version of Bak-ΔBH3 (Bak-ΔBH3-cb5) containing the transmembrane region of cytochrome b5, previously shown to confer exclusive ER targeting (Zong et al., 2003), fully retained the capacity to induce vacuolization (Fig. 5 B). In contrast, a form of Bak-ΔBH3 fused to the ActA peptide, which induces mitochondrial localization (Bak-ΔBH3-

Figure 5. Involvement of ER-localized Bak in the generation of reticular swelling. (A) Perivacuolar localization of AU-Bak, AU-Bcl-X_L, and AU-Bak-ΔBH3. 293T cells were transfected with the indicated constructs along with GFP. 36 h after transfection cells were fixed, stained with an anti-AU mAb followed by an anti-mouse-Cy3 (red) antibody, and mounted for confocal microscopy. N and V denote nuclei and vacuolae, respectively. (B) A version of Bak-ΔBH3 specifically targeted to the ER (Bak-ΔBH3-cb5) retains the capacity to induce ER swelling, whereas mitochondrial targeting (Bak-ΔBH3-ActA) results in a decreased activity. 293T or HeLa cells (as shown) were transfected with the indicated expression plasmids along with GFP. Z-VAD.fmk (100 μM) was added 1 h after transfection to reduce death. 36 h after transfection, cytoplasmic vacuolization was scored as in Fig. 1 B.



ActA; Zhu et al., 1996), showed a decreased activity (Fig. 5 B). Control immunostaining assays indicated that a portion of Bak-ΔBH3-ActA was surprisingly present in reticular membranes, as established by colocalization with calreticulin (unpublished data). This result suggests that human Bak may have additional ER targeting signals able to override ActA. Given this partially reticular localization, Bak-ΔBH3-ActA should not be expected to be completely incapable of inducing ER vacuolization, even if only reticular Bak is active in this context. The localization of the cb5 chimera was tightly reticular (unpublished data). Together, these results further underscore the notion that the ability of Bak to induce vacuolization is linked to its physical presence in the ER.

High calcium levels in the cytoplasm have been shown to induce ER compartmentalization and vacuolization (Subramanian and Meyer, 1997), pointing out to a role of calcium in the regulation of ER structure. Because Bcl-2 family members have the ability to alter ER calcium homeostasis (Nutt et al., 2002; Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2003), the observed reticular swelling induced by Bak might be related to this activity. To test this hypothesis we used chemicals that influence calcium homeostasis in different ways. Chelation of extracellular calcium by EGTA, or treatment with the SERCA pump inhibitor thapsigargin, which allows a passive calcium leakage from ER stores (Breckenridge et al., 2003), had no effect in the degree of vacuolization (unpublished data). Dantrolene is a commercial drug that inhibits ER calcium release through the

RyR calcium channels (Zhao et al., 2001; Fill and Copello, 2002). This drug has been shown to reduce the cytosolic concentration of calcium in some systems (Jacobs et al., 1991). The presence of dantrolene during expression of transfected Bak and Bcl-X_L, or Bak-ΔBH3 alone, had the unexpected effect of exacerbating the vacuolated phenotype (Fig. 6 A). Vacuolae tended to occupy the vast majority of cytoplasmic space in the presence of dantrolene, whereas in its absence they were typically smaller (Fig. 6 A). In contrast, no change was observed in the cytoplasm of cells cotransfected with Bax and Bcl-X_L or either Bak or Bax in the presence of apoptotic blockers like the caspase inhibitor p35 or a dominant-negative version of caspase-9 (unpublished data). This suggests that dantrolene only shows an effect in the presence of an underlying vacuolating stimulus.

Results obtained with dantrolene argue that the observed reticular changes are partially countered by the activity of RyR channels. If this model is true, RyR activation should provoke a reduction of vacuolae size. Among other cellular effects, caffeine activates these channels thus allowing the release of calcium from ER stores (Ozawa, 2001). Treatment of vacuolated cells with caffeine induced a prompt reduction of vacuolae size (unpublished data), and resulted in a lower number of cells presenting a detectable phenotype (Fig. 6 B). Together, these data support a role for RyR calcium channels in regulating Bak-induced ER structural changes and, as a consequence, suggest an involvement of calcium.

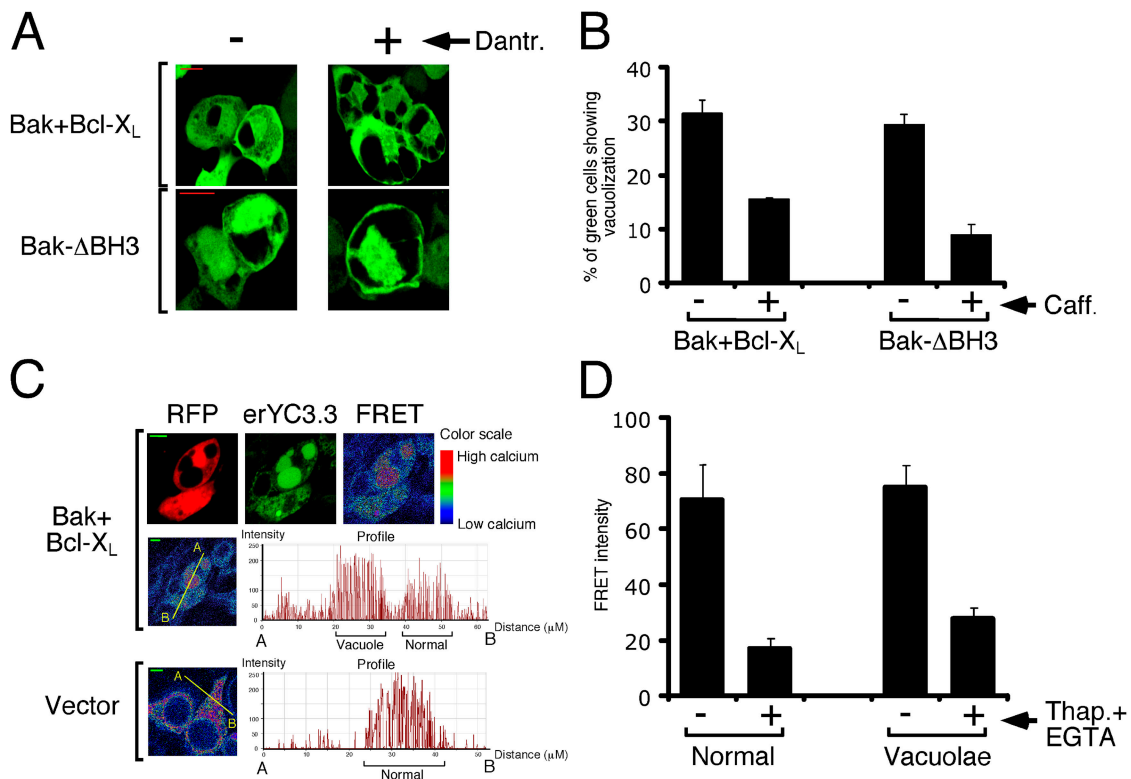


Figure 6. Involvement of RyR calcium channel activity in the regulation of cytoplasmic vacuolization induced by Bak. (A) Treatment with dantrolene potentiates vacuolization. 293T cells were transfected with a mix of the indicated plasmids and a plasmid expressing GFP. Where indicated, dantrolene (50 μ M) was added 1 h after transfection. 36 h after transfection, cells were fixed, mounted, and analyzed by confocal microscopy. Shown are representative fields. The same magnification was used for both control and treated cells. (B) Caffeine treatment reduces vacuolization. 293T cells were transfected as in A. 36 h later, caffeine (20 mM) was added as indicated for 3.5 h, and cells were subsequently fixed and mounted. Quantitation of vacuolated cells was done as in Fig. 1 B. (C) Swollen ER cisternae and normal ER show similar calcium concentrations. 293T cells were transfected with the indicated plasmids in the presence of plasmids expressing cytosolic RFP and a ratiometric calcium indicator (erYC3.3). 36 h after transfection, cells were analyzed *in vivo* by confocal microscopy to obtain FRET intensities of erYC3.3. In the top panel, RFP was used to locate a vacuolated cell in proximity to an unvacuolated neighbor with a similar level of transfection, and emission FRET ratios (535 nm/480 nm) were obtained for both cells. Shown are emissions in red (RFP), green (erYC3.3, 535 nm), and FRET ratios. The middle panel shows a profile of FRET intensities across the indicated yellow line, including both vacuolated (Vacuole) and unvacuolated (Normal) ER. The bottom panel shows a profile of ER FRET intensities of a cell transfected with an irrelevant vector and presenting similar erYC3.3 expression levels as cells in the top panel (measured by emission at 535 nm). (D) Treatment with thapsigargin and EGTA reduces erYC3.3 FRET intensities both in swollen and unaltered ER. 293T cells were cotransfected with Bak, Bcl-X_L, and erYC3.3. 36 h after transfection, both unvacuolated (Normal) and vacuolated (Vacuolae) cells were analyzed *in vivo* to obtain confocal FRET levels in the ER. After capturing FRET images for each untreated cell, 2 mM EGTA and 200 μ M thapsigargin were simultaneously added to the culture, and reticular FRET images acquired after 15 min. This time point showed the maximum effect. To represent the data, mean values of FRET intensities across a chosen section of the ER were obtained for each cell in control and treated conditions. Shown are data averaged for at least five cells analyzed in each experimental condition, along with the corresponding SDs.

To explore this idea, we compared calcium concentrations inside vacuolae with those in normal ER. For this purpose, we cotransfected Bak and Bcl-X_L along with an ER-targeted version of the ratiometric, low affinity calcium indicator yellow cameleon 3.3 (erYC3.3; Miyawaki et al., 1997) and RFP for identification of vacuolated cells. YC3.3 responds to changes in calcium concentrations by altering its spectral properties due to an intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) effect (Miyawaki et al., 1997). Confocal FRET measurements revealed that intensities inside swollen ER were similar to those present in unswollen cisternae of transfected neighboring cells (Fig. 6 C, top and middle). Comparable FRET levels were obtained when the erYC3.3 reporter was cotransfected with an irrelevant vector (Fig. 6 C, bottom). Treatment with EGTA and thapsigargin reduced FRET intensities in both dilated and normal ER (Fig. 6 D), thus confirming the capacity of erYC3.3 to detect calcium variations. These results indicate

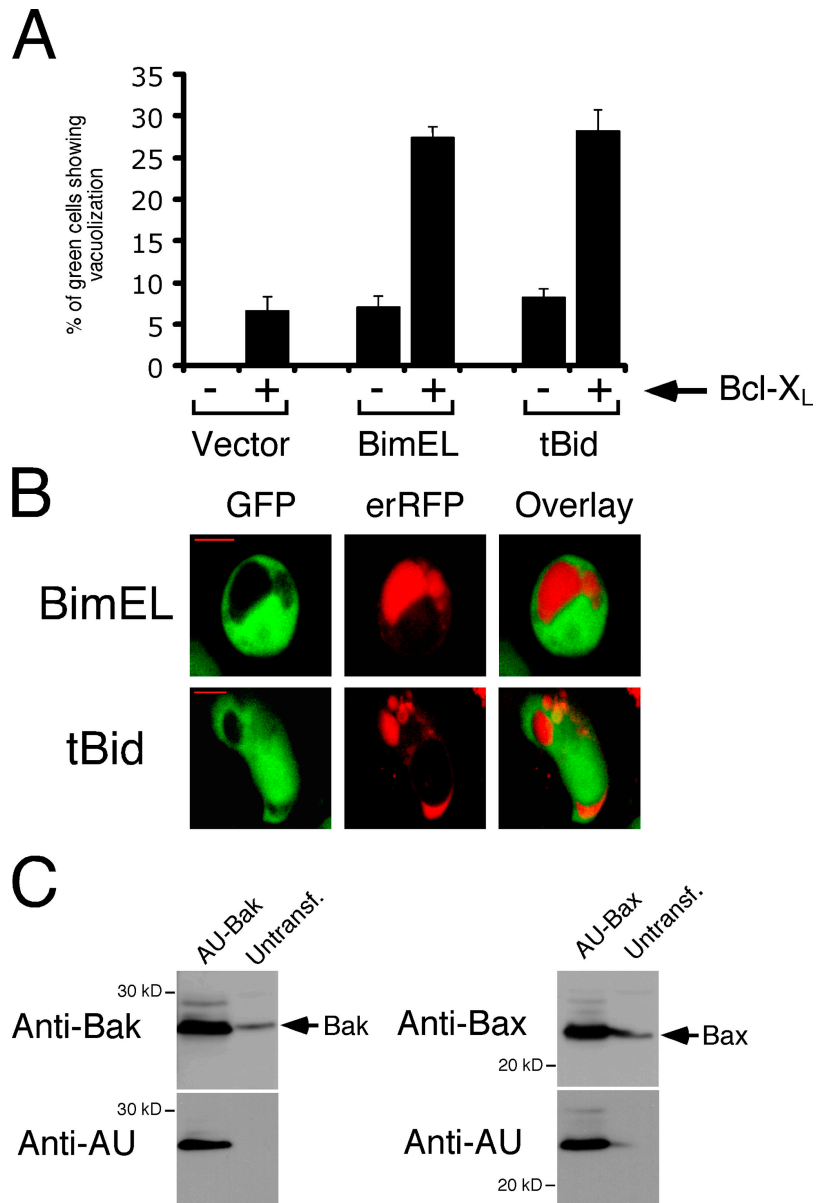
that calcium concentrations present in swollen ER are similar to those in unaltered cisternae. Additional experiments showed no changes in cytoplasmic calcium induced by coexpression of Bak and Bcl-X_L, or Bak-ΔBH3 (unpublished data), measured at different times after transfection with the cytoplasmic, low affinity ratiometric indicator YC2.3 (Miyawaki et al., 1997).

This lack of correlation between reticular swelling and calcium variations, along with the inability of thapsigargin or EGTA to influence vacuolization (unpublished data), argue against a direct involvement of calcium in this phenomenon. Data showing an effect by dantrolene and caffeine suggest a model in which Bak-induced ER remodelling is countered by cytosolic calcium specifically mobilized by RyR channels.

Bak and Bax are physiologically activated by BH3-only homologues like BimEL or Bid (Bouillet and Strasser, 2002). To explore if these upstream effectors are capable of generating a vacuolated phenotype, we transfected cells with plasmids

Figure 7. Coexpression of BimEL or tBid with Bcl-X_L induces ER swelling in the presence of dantrolene. (A)

Quantitation of dantrolene-treated cells showing cytoplasmic vacuolization after transfection with BimEL or tBid, as a function of cotransfection with Bcl-X_L. 293T cells were transfected with a mix of the indicated constructs in the presence of plasmids expressing GFP and the apoptotic inhibitor p35. Dantrolene (50 μM) was added 1 h after transfection to all experimental points. 36 h later the proportion of GFP-expressing cells showing cytoplasmic vacuolization was determined as in Fig. 1 B. (B) ER swelling is the cause of cytoplasmic vacuolization induced by cotransfection of BimEL or tBid with Bcl-X_L in the presence of dantrolene. 293T cells were transfected with plasmids expressing either Bim or tBid (as indicated), in combination with Bcl-X_L, GFP, and erRFP expression plasmids. Dantrolene (50 μM) was added 1 h after transfection. 36 h after transfection, cells were analyzed by in vivo confocal microscopy. (C) 293T cells express endogenous Bak and Bax. Cells were either transfected with the indicated DNAs or left untransfected, and lysed 24 h after transfection. Shown are Western blots probed with antibodies against Bak or Bax (top), and subsequently reprobbed with an anti-AU mAb (bottom) as indicated. Lanes corresponding to transfected cells provide a size reference to identify the endogenous protein. Re-probing with an anti-AU mAb excludes sample contaminations across wells.



expressing either full-length BimEL or a truncated version of Bid (tBid) known to be constitutively active (Li et al., 1998). Coexpression of BimEL or tBid with Bcl-X_L induced a low but detectable number of cells (~1%) to show cytoplasmic vacuolae (unpublished data), suggesting an incipient ER swelling. Given the potentiating effect of dantrolene (Fig. 6 A), we wondered if the drug could turn this weak effect into a vacuolated phenotype easier to identify. The presence of dantrolene from early on after transfection with BimEL or tBid in combination with Bcl-X_L resulted in a substantial number of vacuolated cells (Fig. 7 A), whereas in the absence of Bcl-X_L both molecules induced a more modest phenotype (Fig. 7 A). Cotransfection with erRFP confirmed the reticular origin of the induced vacuolae (Fig. 7 B). Therefore, upstream apoptotic activators can cause ER changes that remain undetectable with the techniques used unless amplified by inhibition of RyR channels. In light of our previous results this effect could be mediated by

endogenous Bak, which, consistent with this model, is present in 293T cells (Fig. 7 C).

To test this possibility, we turned to *bak*^{-/-} and *bax*^{-/-} MEFs. Reminiscent of previous results with 293T cells (Fig. 7 A), transfection of BimEL or tBid in combination with Bcl-X_L induced wild-type MEFs to show cytoplasmic vacuolization in the presence of dantrolene (Fig. 8 A). Vacuolae had a reticular origin as shown by experiments using cotransfected erRFP (unpublished data). Although this phenotype was basically unchanged in Bax-deficient MEFs (Fig. 8 A), the absence of Bak almost completely abolished it (Fig. 8 A). In addition, expression of Bak-ΔBH3 induced a comparable extent of cytoplasmic vacuolization in all tested MEFs (Fig. 8 B), indicating that endogenous full-length Bak is unnecessary for the activity of Bak-ΔBH3. All these results point to a model where upstream ER-remodelling signals are entirely transmitted through endogenous Bak, whereas Bax is for the most part inactive.

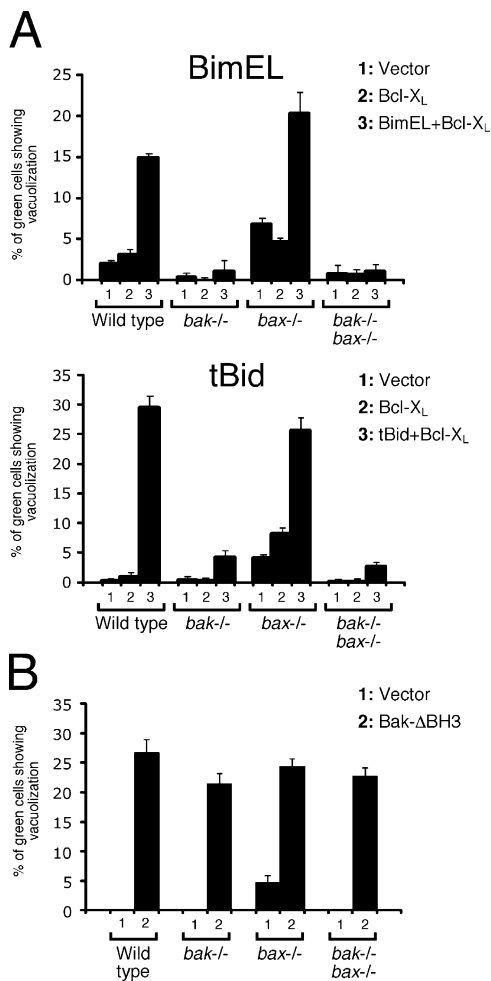


Figure 8. Effect of endogenous Bak and Bax in cytoplasmic vacuolization. (A) Bak-deficient MEFs are unable to generate ER swelling in response to coexpression of BimEL or tBid with Bcl-X_L in the presence of dantrolene. The different MEFs were transfected with a mix of the indicated plasmids and a plasmid expressing GFP. Transfection efficiencies ranged between 20 and 30%. Dantrolene (50 μM) was added 1 h after transfection to all wells. Z-VAD.fmk (100 μM) was also added 1 h after transfection to reduce background death. 48 h later the proportion of GFP-expressing cells showing cytoplasmic vacuolization was determined as in Fig. 1 B. Shown is one representative example of three independent experiments. (B) Expression of Bak-ΔBH3 induces cytoplasmic vacuolization irrespective of the endogenous expression of Bak or Bax. MEFs were cotransfected with the indicated plasmids and a plasmid expressing GFP. Transfection, treatments and scoring were done as in A.

Discussion

Results presented here describe a previously unrecognized activity of Bak in the ER. If activated by Bcl-X_L, overexpressed Bak induces swelling and vacuolization of ER cisternae. Endogenous Bak is also able to transmit similar signals when the pathway is stimulated by upstream BH3-only activators. However, in this case, ER changes are only detected as swollen cisternae after blockade of RyRs, indicating an inhibitory function performed by these calcium channels. Overexpression of signaling effectors is a widely used strategy that often provides hints about function, although excessive expression can lead to artificial phenotypes. The fact that in our system endogenous Bak

can transmit ER changes initiated by BH3-only activators argues against an artifactual origin of the phenomenon induced by coexpression of Bak and Bcl-X_L. Together, these results point to a relevant function of Bak in the regulation of ER structure.

Data shown here also argue that Bcl-X_L can activate Bak to acquire a new function. In this novel functional status, Bak would have the capability to modulate reticular conformation, while its natural pro-apoptotic potential remains inhibited. However, previous reports suggest that these reticular changes might also have death sensitization consequences. For example, a Bak mutant lacking the BH3 domain, whose overexpression causes ER swelling in our hands, increases susceptibility to cell death induced by chemotherapy agents (Simonian et al., 1997), suggesting a link between both phenomena. Coincidentally, a naturally existing BH3-minus Bak version is able to kill cells if overexpressed (Kim et al., 2004). Furthermore, Bcl-X_L does not always block cell death, because in some systems it redirects apoptosis to alternative forms of cell demise such as necrosis (Shinoura et al., 1999). This is compatible with our own unpublished results indicating that, after suffering ER swelling, cells die in a nonapoptotic manner.

A substantial functional redundancy has been previously reported for Bak and Bax. Thus, cells deficient for only one of these mediators remain sensitive to multiple apoptotic inducers, whereas double-deficient cells are widely resistant (Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001; Zong et al., 2001). In addition, only double knockout mice present acute phenotypes (Knudson et al., 1995; Lindsten et al., 2000). Consistent with this redundancy, an overlapping range of cellular activities has been ascribed to these molecules. Both mediators induce mitochondrial apoptosis by inserting into the outer mitochondrial membrane, by promoting their oligomerization, and ultimately by allowing the release of cytochrome *c* from the intermembrane space (Cory et al., 2003). Similarly, both proteins mediate ER-dependent apoptosis by inducing calcium release from reticular cisternae (Nutt et al., 2002). Our results showing that Bak has functions in the ER that are not shared by Bax suggest that this functional similarity may not always apply.

Activities uniquely ascribed to Bak or Bax could help explain some of the discrepancies found in the literature. Thus, despite a high degree of functional redundancy, only Bak is critical for apoptosis induced by chemotherapy drugs (Wang et al., 2001a) or granzyme B (Wang et al., 2001b), whereas Bax has a predominant role in other models (Zhang et al., 2000; Theodorakis et al., 2002; Gillissen et al., 2003). If cell-type or context-dependent cues can increase the relative importance of specific Bak and Bax activities with respect to common BH3-dependent pathways, this could explain why in some systems one molecule can be present but inactive whereas its counterpart is fully functional in transmitting death signals.

The accepted model for mitochondrial apoptosis places BH3-only molecules upstream of Bak and Bax in the signaling cascade (Bouillet and Strasser, 2002). We find that this epistatic sequence is maintained in the function of Bak that we describe here. However, how BH3-only molecules activate Bak to carry out a function that needs an additional activation step provided by Bcl-X_L poses some challenges. This

Bak-associated activity likely requires the formation of Bak-Bcl-X_L complexes. Support for this notion comes from our data showing that the vacuolating potential of Bak is unmasked by deletion of the BH3 domain, precisely the region that Bcl-X_L is known to bind and inhibit (Chittenden et al., 1995a). But in order to expose its BH3 domain and bind Bcl-X_L, Bak has to undergo a structural shift (Sattler et al., 1997), a change thought to be directly induced by BH3-only members Bim or tBid (Desagher et al., 1999; Wei et al., 2000; Letai et al., 2002). Therefore, the probable signaling logic in our system is that BH3-only proteins activate Bak to expose its BH3 domain for binding by Bcl-X_L. However, Bim and tBid are known to preferentially bind anti-apoptotic molecules, saturating protective sites before they activate Bak and Bax (Zong et al., 2001; Cheng et al., 2001; Letai et al., 2002). Obviously, this makes it difficult for activated Bak to find Bcl-X_L molecules not previously occupied by BH3-only homologues. A plausible solution comes from reports showing that Bcl-X_L is mainly a soluble protein that translocates to membrane fractions on apoptosis (Hsu et al., 1997). These data open the possibility that empty Bcl-X_L molecules become available in the ER after Bak activation has occurred.

In addition, the activity described here may involve the formation of a molecular complex simultaneously including BH3-only homologues, Bak and Bcl-X_L. Although Bak is thought to mainly function as a BH3-domain donor, it contains a pocket that can be recognized by the BH3 domain of Bim and Bid (Letai et al., 2002). Whether Bak can bind at the same time BH3-only molecules and Bcl-X_L is an interesting possibility that remains to be investigated.

Although the underlying biochemical nature of ER swelling in our system is unclear, a reasonable possibility is that it is due to an increased osmotic pressure caused by an inward ionic current. Because Bak has been shown to regulate ER calcium levels (Nutt et al., 2002; Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2003), this ion could be involved. However, several lines of evidence argue against a direct role of calcium. First, Bax has been shown to regulate reticular calcium in the same manner as Bak (Nutt et al., 2002; Scorrano et al., 2003), and it is difficult to imagine how a Bak-specific function could be mediated by a common regulatory activity. Second, our own unpublished data indicate that treatment with thapsigargin (an agent that reduces ER calcium levels) does not influence vacuolae formation. Third, we have seen that calcium concentrations both inside vacuolae and in the cytosol remain unchanged in vacuolated cells.

Although calcium is unlikely to be directly involved, results showing that ER swelling is potentiated by dantrolene and inhibited by caffeine point to a regulatory role by RyR channels. Because dantrolene and caffeine respectively reduce (Jacobs et al., 1991) and increase (Ozawa, 2001) cytosolic calcium, a plausible model is that calcium specifically released by RyRs has the ability to counter the reticular alterations. In addition, it is interesting to note that, although reasonably selective, RyR channels are known to allow passage of other cations (Fill and Copello, 2002), thus raising the possibility that an ion other than calcium is involved in the described phenomena.

Other more trivial mechanisms are less likely to occur. For example, it has been described that insertion of the COOH-terminal tail-anchor of cytochrome b5 into reticular membranes causes ER conformational changes in yeast (Vergeres et al., 1993). The fact that deletion of the BH1 domain blocks this process excludes that Bak is unspecifically causing ER structural changes as a consequence of a similar phenomenon.

In summary, we describe here a novel cellular activity that can be unequivocally performed by Bak but not Bax. This exclusive function could explain why in some systems the functional redundancy that has been ascribed to both molecules does not apply. More generally, it provides some insight into the role of multidomain pro-apoptotic effectors in the ER, an organelle whose involvement in the regulation of cell death is just beginning to be dissected.

Materials and methods

Cell lines and reagents

293T, HeLa, and Cos cells were obtained from the American Type Culture Collection. S. Korsmeyer (Harvard Medical School, Boston, MA) provided the wild-type and Bak or Bax-deficient transformed MEFs (Wei et al., 2001). Cells were cultured at 37°C and a humidified 5% CO₂ atmosphere, in DME (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen) and 100 U/ml of penicillin/streptomycin (Invitrogen). Caffeine, dantrolene, EGTA, and thapsigargin were obtained from Sigma-Aldrich. Z-VAD.fmk was obtained from Becton Dickinson.

DNA constructs and transfections

Bak, Bax, BimEL, and tBid cDNAs were amplified by PCR from a human primary T cell cDNA library. All cDNAs were verified by sequencing, contained the same gccaccatg Kozak consensus for initiation of translation, and were cloned into the pEAK series of mammalian expression plasmids (Edge Biosystems). The Bcl-X_L construct was described elsewhere (Pimentel-Muñoz and Seed, 1999). The caspase-9-dominant negative (C9.DN) and p35 expression plasmids (Rabizadeh et al., 2004) were provided by S. Rabizadeh (The Buck Institute for Age Research, Novato, CA). Bak-ΔBH3 was constructed by PCR, substituting the BH3 domain (amino acids 72–88, both deleted) for an EcoRI site, which introduces amino acids EF instead. To create Bak-ΔBH3-ΔBH1, PCR was used to substitute the BH1 domain (amino acids 117–136) for a BamHI site (amino acids GS). PCR was also used to generate both Bak-ΔBH3-cb5 and Bak-ΔBH3-ActA constructs. In brief, the previously described cb5 reticular (Zong et al., 2003) and ActA mitochondrial (Zhu et al., 1996) localization signals were inserted downstream amino acid 186 of human Bak-ΔBH3, using an engineered BbsI site. Template constructs containing mouse Bak-cb5 and human Bcl2-ActA were provided by C. Thompson (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) and D. Andrews (McMaster University, Hamilton, Canada), respectively. cDNAs were tagged at the NH₂ terminus by inserting the relevant PCR product downstream of a sequence encoding the AU1 peptide (DTYRYI). Constructs used in figures where AU tagging is essential (Figs. 1 F, 2 B, 3 C, 5 A, and 7 C) are labeled as such. All other results were reproduced with both tagged and untagged versions. ER-targeted RFP was created by PCR to introduce the COOH-terminal amino acid sequence SEKDEL, able to confer ER retention to heterologous proteins (Munro and Pelham, 1987). This fragment was ligated downstream the leader sequence of the surface molecule CD5, and cloned into the pEAK vector. A similar approach was used to build the ER-targeted version of the low affinity calcium indicator YC3.3 (Miyawaki et al., 1997), which was provided by R. Tsien (University of California, San Diego, La Jolla, CA).

Transfections of 293T cells were performed using the calcium phosphate precipitation method (Ausubel et al., 1987). DNA amounts were 1 μg for 24-well plates and 5 μg for 6-well plates. HeLa, Cos, and MEFs were always transfected in 24-well plates using Eugene (Roche) liposomes combined with 0.4 μg of DNA.

Immunofluorescence stainings, microscopy, and FRET analysis

In vivo quantitation of vacuolated cells and immunofluorescence studies were always performed in 24-well plates. For immunofluorescence, cells

were seeded onto poly-L-lysine (293T; Sigma-Aldrich) or tissue culture-treated (for Cos and HeLa cells; Fisher Scientific) coverslips, and transfected the next day. At the end of the experiment, coverslips were fixed in 4% PFA (Sigma-Aldrich). For DAPI and antibody stainings, cells were permeabilized in PBS containing 0.5% Igepal CA-630 detergent (Sigma-Aldrich) and 1% glycine to block free aldehyde groups. To stain with DAPI, an additional incubation in PBS with 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (Roche) was performed. For antibody stainings, preparations were blocked in 3% BSA diluted in PBS and stained for 1 h with an anti-AU1 mAb (2 $\mu\text{g/ml}$; Babco), or a polyclonal rabbit anti-calreticulin serum (1/100; Calbiochem). The respective secondary stainings were performed for 1 h using a 1/400 dilution of a Cy3-coupled goat anti-mouse serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit serum (Molecular Probes). Cells were mounted in medium containing Mowiol 4-88 (Calbiochem) prepared as described previously (Harlow and Lane, 1988).

Cytoplasmic vacuolization was usually scored *in vivo* under an inverted fluorescence microscope (Axiovert 135; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) using the 20 \times objective. For confocal studies we used the 488- and/or 543-nm bands of the Argon and Helium-Neon lasers, respectively, of a confocal microscope (model LSM-510; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Images were imported using the LSM-510 software (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). For *in vivo* confocal microscopy, coverslips with transfected cells were placed in a microscopy quality glass-bottom plate (WillCo) and analyzed with the same confocal system. Confocal FRET measurements were done *in vivo* using the same technique, stimulating cells with the 458-nm band of the Argon laser. To calculate FRETs, the ratio of emission intensities at 535–480 nm was calculated for each pixel using the LSM-510 Zeiss software. Bars represent 10 μm in all micrographs.

Western blotting

Cells were seeded in 6-well plates and transfected the next day. At the end of the experiment, cells were lysed in a buffer containing 1% Igepal CA-630 detergent (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, and protease inhibitors aprotinin (10 $\mu\text{g/ml}$), leupeptin (10 $\mu\text{g/ml}$), and PMSF (1 mM; Roche). After a 5-min centrifugation, protein concentrations were measured using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories). Equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore), and probed with specific antibodies against PARP (clone C2-10, mAb; Becton Dickinson), AU1 (mAb; Babco), Bak (rabbit polyclonal; Becton Dickinson), or Bax (N-20, rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After an additional incubation with appropriate secondary HRP-coupled antibodies (DakoCytomation), blots were developed by chemiluminescence using the ECL system (Amersham Biosciences). When re-probed, membranes were previously stripped for 15 min in a 7 M guanidinium hydrochloride (Sigma-Aldrich) solution.

We thank Dr. Korsmeyer for the Bak and Bax-deficient MEFs, Dr. Rabizadeh for the C9.DN and p35 plasmids, Drs. Thompson and Andrews for constructs containing cb5 and ActA peptides, Dr. Tsien for the Cameleon YC3.3 and YC2.3 calcium indicators, Drs. Bustelo, García-Higuera, and Pichel for critical reading of the manuscript, Dr. Santos for his excellent confocal expertise, and members of the Centro de Investigación del Cáncer for support.

This work was funded by grants SAF2002-00193 and GEN2003-20239-CO6-05 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spanish Government). M. Klee is the recipient of a predoctoral fellowship from the Formación de Profesorado Universitario program of the Spanish Ministry of Education. F.X. Pimentel-Muiños is an investigator affiliated with the University of Salamanca and funded by the Ramón y Cajal program of the Spanish Government.

Submitted: 30 August 2004

Accepted: 3 January 2005

References

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

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 9.1.1–9.1.11.

Bouillet, P., and A. Strasser. 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.* 115:1567–1574.

Breckenridge, D.G., M. Germain, J.P. Mathai, M. Nguyen, and G.C. Shore. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 22:8608–8618.

Cheng, E.H., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, and S.J. Korsmeyer. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*. 8:705–711.

Chittenden, T., C. Flemington, A.B. Houghton, R.G. Ebb, G.J. Gallo, B. Elangovan, G. Chinnadurai, and R.J. Lutz. 1995a. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14:5589–5596.

Chittenden, T., E.A. Harrington, R. O'Connor, C. Flemington, R.J. Lutz, G.I. Evan, and B.C. Guild. 1995b. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 374:733–736.

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

Daniel, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205–219.

Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson, and J.C. Martinou. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* 144:891–901.

Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson, and J.C. Martinou. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* 20:929–935.

Fill, M., and J.A. Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82:893–922.

Gillissen, B., F. Essmann, V. Graupner, L. Starck, S. Radetzki, B. Dorken, K. Schulze-Osthoff, and P.T. Daniel. 2003. Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J.* 22:3580–3590.

Green, D.R., and J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281:1309–1312.

Griffiths, G.J., L. Dubrez, C.P. Morgan, N.A. Jones, J. Whitehouse, B.M. Corfe, C. Dive, and J.A. Hickman. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144:903–914.

Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 726 pp.

Hsu, Y.T., and R.J. Youle. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 272:13829–13834.

Hsu, Y.T., K.G. Wolter, and R.J. Youle. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:3668–3672.

Jacobs, A.E., A.A. Benders, A. Oosterhof, J.H. Veerkamp, R.A. Wevers, and E.G. Joosten. 1991. Effect of various agents on the cytoplasmic calcium concentration in cultured human muscle cells. *Int. J. Biochem.* 23:93–99.

Kim, J.K., K.S. Kim, J.Y. Ahn, N.K. Kim, H.M. Chung, H.J. Yun, and K.Y. Cha. 2004. Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:18–23.

Knudson, C.M., K.S. Tung, W.G. Tourtellotte, G.A. Brown, and S.J. Korsmeyer. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 270:96–99.

Letai, A., M.C. Bassik, L.D. Walensky, M.D. Sorcinelli, S. Weiler, and S.J. Korsmeyer. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2:183–192.

Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491–501.

Lindsten, T., A.J. Ross, A. King, W.X. Zong, J.C. Rathmell, H.A. Shiels, E. Ulrich, K.G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, et al. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell*. 6:1389–1399.

Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, and R.Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 388:882–887.

Munro, S., and H.R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48:899–907.

Nutt, L.K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D.J. McConkey, and S.G. Swisher. 2002. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 277:9219–9225.

Ozawa, T. 2001. Ryanodine-sensitive Ca^{2+} release mechanism in non-excitable cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 7:21–25.

Pimentel-Muiños, F.X., and B. Seed. 1999. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity*. 11:783–793.

Rabizadeh, S., R.J. Xavier, K. Ishiguro, J. Bernabeortiz, M. Lopez-Illasaca, A. Khokhlatchev, P. Mollahan, G.P. Pfeifer, J. Avruch, and B. Seed. 2004. The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor

RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 279:29247–29254.

- Reed, J.C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 17:3225–3236.
- Rizzuto, R., P. Pinton, D. Ferrari, M. Chami, G. Szabadkai, P.J. Magalhaes, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. 2003. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*. 22:8619–8627.
- Sattler, M., H. Liang, D. Nettesheim, R.P. Meadows, J.E. Harlan, M. Eberstadt, H.S. Yoon, S.B. Shuker, B.S. Chang, A.J. Minn, et al. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275:983–986.
- Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*. 300:135–139.
- Shinoura, N., Y. Yoshida, A. Asai, T. Kirino, and H. Hamada. 1999. Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene*. 18:5703–5713.
- Simonen, M., H. Keller, and J. Heim. 1997. The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 249:85–91.
- Simonian, P.L., D.A. Grillot, and G. Nunez. 1997. Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2. *Oncogene*. 15:1871–1875.
- Subramanian, K., and T. Meyer. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell*. 89:963–971.
- Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 103:645–654.
- Theodorakis, P., E. Lomonosova, and G. Chinnadurai. 2002. Critical requirement of BAX for manifestation of apoptosis induced by multiple stimuli in human epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 62:3373–3376.
- Van Cruchten, S., and W. Van Den Broeck. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31:214–223.
- Vergeres, G., T.S. Yen, J. Aggeler, J. Lausier, and L. Waskell. 1993. A model system for studying membrane biogenesis. Overexpression of cytochrome b5 in yeast results in marked proliferation of the intracellular membrane. *J. Cell Sci.* 106:249–259.
- Wang, G.Q., B.R. Gastman, E. Wieckowski, L.A. Goldstein, A. Gambotto, T.H. Kim, B. Fang, A. Rabinovitz, X.M. Yin, and H. Rabinowich. 2001a. A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 276:34307–34317.
- Wang, G.Q., E. Wieckowski, L.A. Goldstein, B.R. Gastman, A. Rabinovitz, A. Gambotto, S. Li, B. Fang, X.M. Yin, and H. Rabinowich. 2001b. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* 194:1325–1337.
- Wei, M.C., T. Lindsten, V.K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14:2060–2071.
- Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727–730.
- Xiang, J., D.T. Chao, and S.J. Korsmeyer. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:14559–14563.
- Zhang, L., J. Yu, B.H. Park, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 2000. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*. 290:989–992.
- Zhao, F., P. Li, S.R. Chen, C.F. Louis, and B.R. Fruen. 2001. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.* 276:13810–13816.
- Zhu, W., A. Cowie, G.W. Wasfy, L.Z. Penn, B. Leber, and D.W. Andrews. 1996. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* 15:4130–4141.
- Zong, W.X., T. Lindsten, A.J. Ross, G.R. MacGregor, and C.B. Thompson. 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.* 15:1481–1486.
- Zong, W.X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q.C. Yu, J. Yuan, and C.B. Thompson. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162:59–69.