

UCH-FC
DOE-DMCN
G216
C.1

**Identificación de los determinantes moleculares
claves para la función de Bcl-2 en la membrana
mitocondrial externa**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,

Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Carlos José García Riveros

Enero, 2007

Director de Tesis: Dr. Patricio Vélez Silva.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Carlos José García Riveros

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Celular, Molecular y Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Noviembre 2006.

Director de Tesis:

Dr. Patricio Vélez Silva

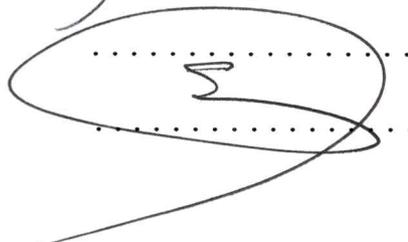
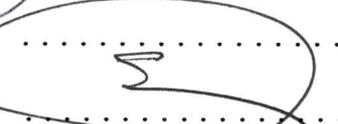
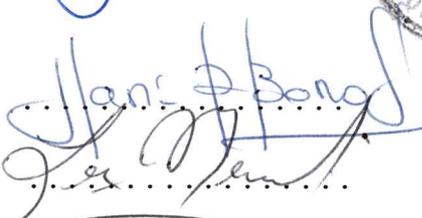
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono

Dra. Lee Ann Meisel

Dr. Juan Guillermo Reyes

Dr. Sergio Lavanderos



Dedicada a Javiera y Virginia, mis dos grandes amores.





Carlos José García Riveros. Bioquímico, interesado en comprender el mecanismo mediante el cual las células regulan su muerte. Primero estudié la expresión diferencial del poro de permeabilidad transitoria durante la espermatogénesis, para luego estudiar el detalle molecular del mecanismo de acción de dos proteínas claves en la modulación de la apoptosis, Bax y Bcl-2. Descubrimos que el extremo C-terminal de Bcl-2 no se requiere para su asociación a la mitocondria. Sin embargo, se requiere para regular la permeabilidad mitocondrial, contrario al modelo de acción aceptado, en el que el extremo C-terminal permitir que Bcl-2 se asocie a la mitocondria.



AGRADECIMIENTOS

1. **Marcia Cortés, por su valiosa asistencia técnica.**
2. **Ignacio Valencia, por asistencia técnica en los registros electrofisiológicos.**
3. **Rodrigo González, por facilitar los registros electrofisiológicos de alta conductancia de Bax.**
4. **Solange Golusda, Pablo Tapia y Dr. Juan Reyes, por asistencia en la estimación en los cambios de potencial de membrana mitocondrial.**
5. **Juan Carlos Espinoza y Dr. Juan Kuznar, por facilitar su laboratorio en innumerables ocasiones**
6. **A todos los miembros del centro de neurociencias molecular y celular de Valparaíso, CNV.**
7. **A MECESUP y a proyecto FONDECYT 1020927 por otorgar financiamiento durante el post-grado.**



ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
FUNCIÓN de Bax y Bcl-2 EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL	
EXTERNA (MME)	5
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
I. Materiales	12
Ia. Anticuerpos	12
Ib. Reactivos	13
II. Purificación de Bcl-2 y Bax	14
III. Mutación del extremo C-terminal de Bcl-2	16
IV. Liberación del citocromo c.	17
V. Inserción de Bcl-2 y Bax en la membrana mitocondrial	18
VI. Entrecruzamiento de Proteínas	18
VII. Bicapas lipídicas planas	19
VIII. Co-inmunoprecipitación	20
IX. Estimación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial con la sonda fluorescente Rodamina 123	20
RESULTADOS	23



1. Purificación de Bax y Bcl-2	23
2. Caracterización funcional de Bax y Bcl-2	27
2a. Interacción entre Bcl-2 y la membrana mitocondrial	27
2b. Interacción de Bax con la membrana mitocondrial y liberación del citocromo c.	30
2c. Activación de Bax.	32
3. La liberación de citocromo c inducida por Bax es inhibida por Bcl-2 <i>in vitro</i>	38
4. Interacción de Bcl-2 y Bax con membranas lipídicas sintéticas	40
5. Antimicina A₃ Inhibe la función de Bcl-2 en la membrana mitocondrial	43
6. Papel del extremo C-terminal de Bcl-2 en la interacción con la membrana mitocondrial	48
7. Papel del extremo C-terminal en la función de Bcl-2 en la membrana mitocondrial	55
8. Interacción entre Bcl-2 y Bax en la membrana mitocondrial, ensayo de co-inmunoprecipitación	62
9. Papel del extremo C-terminal de Bcl-2 en el control del potencial de membrana mitocondrial.	66
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIÓN	80
REFERENCIAS	81
ANEXOS	86

ANEXO I. Determinación del rango dinámico de la tinción de plata para geles de poliacrilamida.	86
ANEXO II. Determinación del efecto de β octil-glucósido sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial.	88
ANEXO III. Efecto de β octil-glucósido en la actividad Electrofisiológica de Bax.	90
ANEXO IV. Vector de expresión pProEX-1.	92
ANEXO V. Curvas de crecimiento de <i>E.coli</i> M15 transformadas Con Bax y Bcl-2.	93



LISTA DE TABLAS

	Página
1. ANTICUERPOS	12
2. REACTIVOS	13



LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Familia Bcl-2	4
2. Bolsillo hidrofóbico de Bcl-2	7
3. Bcl-2 y Bax en la mitocondria	9
4. Purificación de Bax y Bcl-2	24
5. Unión de Bcl-2 a membranas mitocondriales	29
6. Bax sea asocia a la membrana mitocondrial y promueve la liberación de citocromo c.	31
7. β octil-glucósido induce la oligomerización de Bax	34
8. Dependencia temporal de la liberación de citocromo c inducida por Bax.	37
9. Bcl-2 inhibe la liberación de citocromo c inducida por Bax.	39
10. La Interacción de Bcl-2 y Bax a membranas lipídicas sintéticas generan actividad electrofisiológica.	42
11. Modelo molecular de Bcl-2 asociada a antimicina A ₃	44
12. Antimicina A ₃ inhibe la función de Bcl-2 en al membrana mitocondrial.	47
13. Extremo C-terminal de Bcl-2.	48
14. Modelo de inserción de Bcl-2 y mutantes en el extremo C-terminal.	51
15. Purificación de mutantes de Bcl-2.	53

16. Bcl-2 ΔC11 y Bcl-ΔC21 se integran a la membrana mitocondrial.	54
17. Papel funcional del extremo C-terminal de Bcl-2.	57
18. Papel del segmento TM de Bcl-2 en la regulación de la liberación de factores pro-apoptóticos inducida por Bax.	61
19. Bcl-2 y Bax interactúan en la membrana mitocondrial.	64
20. Papel funcional del extremo C-terminal de Bcl-2 en el control del potencial de membrana mitocondrial.	69
21. Modelo de inserción de mutantes de Bcl-2 en el extremo C-terminal.	77
22. Figura ANEXO I. Determinación del rango dinámico de la tinción de plata para geles de poliacrilamida.	87
23. Figura ANEXO II. Efecto de β octil-glucósido sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial.	89
24. Figura ANEXO III. Bax forma poros de alta conductancia en bicapas lipídicas planas.	91
25. Figura ANEXO IV Vector de expresión pProEX-1.	92
26. Figura ANEXO V. Curva de crecimiento de <i>E.coli</i> M15/Bcl-2 y <i>E.coli</i> M15/Bax.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AA: Antimicina A₃
2. Apaf-1: *Apoptosis protease-activating factor-1*.
3. AIF: *Apoptosis inducing factor*.
4. Bax: *Bcl-2 associated X protein*.
5. Bcl-2: *B cell lymphoma 2*.
6. BH: *Bcl-2 homology domain*.
7. BSA: Albúmina de suero bovino.
8. Caspasa: Cisteina aspartil proteasa.
9. cit c. Citocromo c.
10. CMC: Concentración micelar crítica.
11. IPTG: Isopropil tio-β-D-galactopiranosido
12. MME: Membrana mitocondrial externa
13. OMM: *Outer mitochondrial membrane*.
14. SDS-PAGE: *SDS- poliacrilamide gel electroforesis*
15. UA: Unidades de absorbancia

RESUMEN

Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica que previene la salida factores pro-apoptóticos, como el citocromo c (cit c) y el factor inductor de la apoptosis (AIF), desde la mitocondria durante el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual Bcl-2 regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial a estos factores pro-apoptóticos. En condiciones fisiológicas, Bcl-2 se encuentra anclada principalmente en la membrana mitocondrial externa (MME), y en menor proporción, en la membrana del retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear. La particular distribución intracelular de Bcl-2 parece estar regulada por su extremo C-terminal. Este dominio está compuesto en un 90 % por aminoácidos apolares, los que en contacto con la bicapa lipídica permiten el anclaje de esta proteína en membranas intracelulares. Bcl-2 esta compuesta 4 dominios BH (BH: *Bcl-2 homology domain*) que son conservados entre miembros de la familia Bcl-2. Los dominios BH permiten la interacción proteína-proteína entre miembros de la familia. La estructura en solución de Bcl-2 predice que el plegamiento de los dominios BH1, BH2 y BH3 forma un bolsillo hidrofóbico (23), el cual es un sitio de unión para el dominio BH3 de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como Bax (40). Estudios mutagenéticos en el dominio BH3 de Bcl-2 y de Bax, sugieren que es un dominio clave para la interacción de estas proteínas (45). Sin embargo, estos estudios del dominio BH3 se realizaron considerando las moléculas en solución, lo cual no necesariamente representa

lo que ocurre cuando estas proteínas se encuentran asociadas a la MME. Probablemente, la inserción de Bcl-2 en la MME induce la re-estructuración de la molécula, por lo que la interacción con el dominio BH3 de Bax no ocurriría como lo plantean los modelos en solución. Por otro lado, la función del extremo C-terminal de Bcl-2 no sólo sería destinar la proteína a organelos intracelulares, sino que también, sería regular su actividad al participar directamente en el mecanismo de interacción con proteínas pro-apoptóticas. Proponemos que el dominio BH3 y el extremo C-terminal de Bcl-2 participan en el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Para comprobar nuestra hipótesis, se combinó la expresión y purificación de proteínas recombinantes, con ensayos de liberación de la proteína cit c, entrecruzamiento de proteínas y co-inmunoprecipitación. Inicialmente, estudiamos el papel del dominio BH3 en la función de Bcl-2, para lo cual se utilizó el inhibidor estructural, antimicina A₃. Este compuesto, se une al bolsillo hidrofóbico de Bcl-2, bloqueando el sitio de interacción con otras proteínas. Para explorar la participación del extremo C-terminal de Bcl-2 en la modulación de la permeabilidad mitocondrial, se purificaron dos mutantes a las cuales se les eliminaron 11 (Bcl-2 Δ C11) y 21 (Bcl-2 Δ C21) residuos de sus extremos C-terminal y se ensayó la capacidad de éstas de interaccionar con la membrana mitocondrial e inhibir la salida del cit c inducida por Bax. Consistente con su función pro-apoptótica, nuestros resultados muestran que, Bax recombinante se asocia a la membrana mitocondrial y promueve de manera dependiente de la concentración, la liberación del cit c

desde mitocondrias purificadas. Por otro lado, Bcl-2 purificada suprime la acción de Bax en mitocondrias aisladas, efecto que es bloqueado por antimicina A₃. Interesantemente, Bcl-2ΔC11 y Bcl-2Δ21 mantuvieron la capacidad de interaccionar con la membrana mitocondrial al igual que la proteína de largo total. Sin embargo, las mutantes en el extremo C-terminal no inhiben la acción de Bax con la misma eficacia que Bcl-2 de largo total. Estos resultados demuestran por primera que el extremo C-terminal no es necesario para que Bcl-2 se asocie a la MME, pero sí es un determinante molecular importante para la modulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

ABSTRACT

Bcl-2 is an anti-apoptotic protein that prevents the release of pro-apoptotic factors, like cytochrome c (cyt c) and the apoptosis inducing factor (AIF), from mitochondria during the programmed cell death process or apoptosis. However, the molecular mechanism by which Bcl-2 regulates the permeability of the mitochondrial membrane to these pro-apoptotic factors is still unknown. Under physiological conditions, Bcl-2 is found anchored mainly to the outer mitochondrial membrane (OMM), and in minor extent, to the endoplasmic reticulum membrane and nuclear envelope. The particular intracellular distribution of Bcl-2 seems to be regulated by its C-terminal tail. This domain is composed in 90 % by hydrophobic residues, which in contact with the lipid bilayer allows this protein to be anchored to intracellular membranes. Bcl-2 has 4 BH domains (BH: Bcl-2 homology domains) which are conserved among members of the Bcl-2 family. The BH domains allow protein-protein interaction within family members. The solution structure analysis of Bcl-2 suggest that the folding of domains BH1, BH2 and BH3 forms an hydrophobic pocket (23), which is a binding site for the BH3 domains of pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, like Bax (40). Mutagenesis studies within Bcl-2 and Bax BH3 domain, suggest that it is a key determinant for the interaction of this proteins (45). Nonetheless, these studies on the BH3 domain where done considering molecules in aqueous solution, which may not necessarily represent the situation when these proteins are associated to the OMM. Probably, the insertion of Bcl-2 in the OMM

promotes the structural change of the molecule, and the interaction of the Bax BH3 domain may not resemble the proposed model in aqueous solution. On the other hand, Bcl-2 C-terminal tail not only would be related to the targeting of Bcl-2 to intracellular organelles, but also would directly interact with and modulate the pro-apoptotic proteins. We propose that the BH3 domain and the C-terminal tail of Bcl-2 regulates the permeability of the mitochondrial membrane. To test our hypothesis was combined the expression and purification of recombinant proteins, with cyt c release assays, protein crosslinking and co-immunoprecipitation. Initially, we studied the BH3 domain on Bcl-2 function with the structural inhibitor, antimycin A₃. This compound binds to the hydrophobic pocket of Bcl-2 blocking the interaction site with other proteins. To explore the participation of the Bcl-2 C-terminal in the modulation of mitochondrial membrane permeability, two mutants lacking 11 (Bcl-2ΔC11) or 21 (Bcl-2ΔC21) residues of the C-terminal were assayed on their capability interact with the mitochondrial membrane and to prevent the cyt c release induced by Bax. Consistent with its pro-apoptotic function, our results show that recombinant Bax associates to the mitochondrial membrane and promotes in a dose dependent fashion the release of cyt c from isolated mitochondria. On the other hand, purified Bcl-2 suppressed the action of Bax on isolated mitochondria, an effect blocked by antimycin A₃. Even though Bcl-2ΔC11 and Bcl-2Δ21 retain the capability to associate to the mitochondrial membrane, they do not inhibit the Bax action in the same extent that full-length Bcl-2. These findings demonstrate for the first time that the C-

terminal is not necessary for Bcl-2 membrane anchoring, being an important molecular determinant for mitochondrial membrane permeability modulation.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular es uno de los procesos fisiológicos más importante para la vida dentro de los organismos multicelulares. La muerte celular programada o "apoptosis", permite la eliminación controlada de células, lo cual es vital durante el desarrollo, así como también para la homeostasis de los diversos tejidos. Del mismo modo, mediante el mecanismo de la apoptosis se controla la acumulación de células defectuosas o que han sido infectadas por virus u otros agentes patógenos. La clave del funcionamiento del proceso apoptótico radica en el mecanismo molecular de su control, y sin duda, la disfunción de la maquinaria que ejecuta la apoptosis es la base molecular de diferentes patologías neurodegenerativas y principalmente del cáncer.

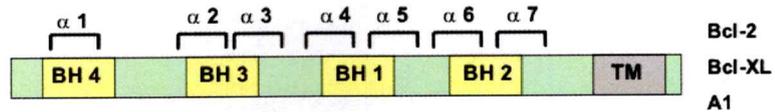
La cascada de señalización que conduce a la apoptosis puede ser gatillada por un estímulo extracelular a través de la activación de receptores en la membrana plasmática o mediante la activación directa de diversas proteínas intracelulares que actúan a través de las mitocondrias. Estos dos mecanismos generales de activación de la apoptosis se han clasificado como la vía extrínseca y la vía intrínseca, respectivamente. Ambas vías de activación del proceso apoptótico tiene como blanco final la activación de una familia de cisteína-proteasas, conocidas como caspasas, las que degradan proteínas claves para el funcionamiento de la célula. Particularmente, el enfoque de esta tesis consiste en abordar aspectos moleculares de la regulación de la apoptosis a nivel mitocondrial, dejando aparte, aunque no menos importante, la activación

directa de caspasas que ocurre en la vía extrínseca de activación de la apoptosis (2, 43). La mitocondria es conocida por su papel en el control del metabolismo celular. Sin embargo, diversas señales que modulan la apoptosis convergen interesantemente en este organelo. Probablemente, este hecho podría corresponder a una estrategia evolutiva, siendo el mecanismo molecular básico para paralizar el funcionamiento de la célula y colapsar la principal fuente energética. La mitocondria contiene diversas proteínas como citocromo c (cit c) y endonucleasa G a las cuales se les ha descubierto actividad dual (11, 14). Particularmente, el cit c localizado en el espacio intermembrana de la mitocondria, permite el transporte de electrones a través de los complejos proteicos que forman parte de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. No obstante, la fuga del cit c desde la mitocondria hacia el citosol es un evento que inicia el desmantelamiento celular. Por esta razón, este evento constituye el punto de no retorno en la activación de la apoptosis. La presencia del cit c en el citosol promueve la formación de un complejo proteico entre esta proteína y el adaptador Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) el que unido a la pro-caspasa 9 forma el apoptosoma (43). Este complejo proteico promueve la activación de caspasa 9, la cual inicia una cascada de activación de una serie de caspasas que terminan procesando proteínas claves para el funcionamiento celular. La regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial a este tipo de factores pro-apoptóticos parece estar bajo el control de las proteínas de la familia Bcl-2 (11, 42). Esta familia está formada, por al menos, 30 miembros que tienen en común los denominados

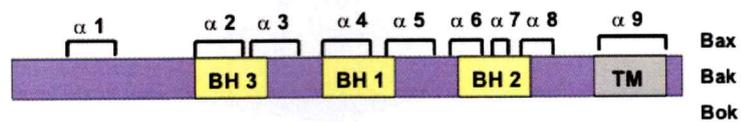
dominios de homología a Bcl-2 (dominios BH; Figura 1). La familia se divide en dos grupos de proteínas, uno que promueve la sobrevivencia celular (anti-apoptóticas), y otro que promueve la muerte celular (pro-apoptóticas). El grupo de las anti-apoptóticas está compuesto por proteínas que contienen los cuatro dominios BH conocidos, por ejemplo Bcl-2 y sus homólogos Bcl-X_L y Bcl-w (Figura 2A). El segundo grupo está compuesto por proteínas que contienen tres de los dominios BH (BH1, BH2 y BH3), por ejemplo Bax y Bak, así como también por proteínas que contienen solo el dominio BH3, como Bid y Bad. Los dominios BH permiten la interacción proteína-proteína entre miembros de la familia, dando lugar a la formación de homómeros y/o heterómeros. Los estudios estructurales sobre Bcl-2, Bcl-x_L, Bax y Bcl-w (23, 24) muestran que los dominios BH1, BH2 y BH3 se pliegan de tal forma que los residuos apolares de las α hélices que contienen estos dominios quedan orientadas hacia el interior de la molécula, formando un bolsillo hidrofóbico (Figura 2B). Los datos estructurales y funcionales de las proteínas Bax y Bcl-w, han permitido determinar que en el bolsillo hidrofóbico de estas proteínas aloja su extremo C-terminal, lo cual mantiene a estas proteínas distribuidas en el citosol (24, 36). Este sitio de unión de proteínas, permite la formación de hetero-oligómeros a través de la interacción del dominio BH3 de proteínas pro-apoptóticas, como Bak, Bax y Bid (18, 36), con el bolsillo hidrofóbico de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, Bcl-x_L y Bcl-w, lo cual representa un mecanismo posible de regulación de la actividad celular de esta familia de proteínas. Otra

característica importante que poseen en común gran parte de los miembros de la familia Bcl-2, es el extremo C-terminal hidrofóbico.

Anti-apoptóticas



Pro-apoptóticas



Solo dominio BH3

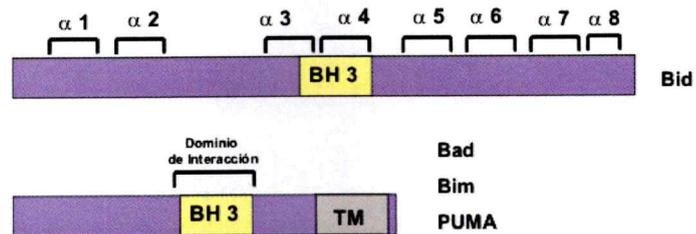


Figura 1. Familia Bcl-2. La figura presenta un esquema de la distribución de los dominios BH en la secuencia primaria de varias proteínas de la familia Bcl-2. Los miembros de la familia Bcl-2 poseen al menos uno de 4 de los dominios conservados BH. Los miembros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-X_L y A1, poseen los cuatro dominios BH, mientras que dentro de las proteínas pro-apoptóticas se encuentran algunas que poseen los dominios BH1, BH2 y BH3, como Bax y Bak, mientras que otras solo poseen el dominio BH3, como Bad, Bid y PUMA.

Estudios funcionales con quimeras entre proteínas citosólicas y el extremo C-terminal de Bcl-2 sugieren que éste sería una secuencia de destinación para esta proteína (20). No obstante no existe evidencia clara que demuestre directamente la función del extremo C-terminal de Bcl-2 en su actividad anti-apoptótica en la membrana de la mitocondria. El objetivo general de esta tesis es definir que determinantes moleculares de la proteína Bcl-2 que se encuentran involucrados en la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

FUNCIÓN DE Bcl-2 y Bax EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA (MME)

En condiciones celulares normales, vale decir en ausencia de estímulos pro-apoptóticos, la proteína Bcl-2 se encuentra principalmente en la mitocondria (12), mientras que la proteína Bax se encuentra soluble en el citosol (7). Sin embargo frente a un estímulo de muerte, Bax transloca desde el citosol hacia la MME, lugar donde oligomeriza y promueve la liberación del cit c (11, 42). La Figura 3 muestra un esquema que representa un modelo de acción de Bcl-2 y Bax a nivel mitocondrial. Tanto Bax como Bcl-2 carecen de secuencias de destinación conocidas. Sin embargo, su anclaje a membranas intracelulares parece depender del extremo C-terminal (20, 25) altamente hidrofóbico y común entre varias proteínas de esta familia, no obstante se carece de información en la cual se defina el papel funcional de este dominio de Bcl-2. Actualmente existen diferentes hipótesis que intentan explicar el mecanismo de acción de

Bcl-2. Uno de estos modelos postula que Bcl-2 evitaría que Bax module la actividad de proteínas intrínsecas de la membrana mitocondrial, por ejemplo, regulando la apertura del poro de permeabilidad transitoria (4), probablemente inhibiendo la interacción de Bax con alguna de las proteínas que componen este complejo proteico, como VDAC (*voltaje dependent anion channel*). Otro modelo propone que Bax oligomeriza en la MME, formando poros proteicos que permitirían el tránsito de macromoléculas hacia el citosol. En este sentido, la acción inhibitoria de Bcl-2, sería evitando la formación de oligómeros de Bax. Esta hipótesis estaría avalada por la teoría del balance entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, en la cual la regulación de estas proteínas sería principalmente a través de interacción proteína-proteína, donde la sobre expresión de un tipo de ellas definiría el destino celular.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual Bcl-2 y Bax modulan la permeabilidad de la MME. Sin embargo, ambas hipótesis sugieren que la interacción proteína-proteína entre Bcl-2 y Bax sería un aspecto relevante en el funcionamiento de estas proteínas, lo cual ocurriría cuando estas proteínas se encuentran en la membrana mitocondrial. Inicialmente, mediante ensayos de doble híbrido (29, 30) y de co-inmunoprecipitación (21) se demostró que Bcl-2 y Bax forman hetero-dímeros, lo cual dependería directamente de los residuos presentes en el dominio BH3 de ambas proteínas.

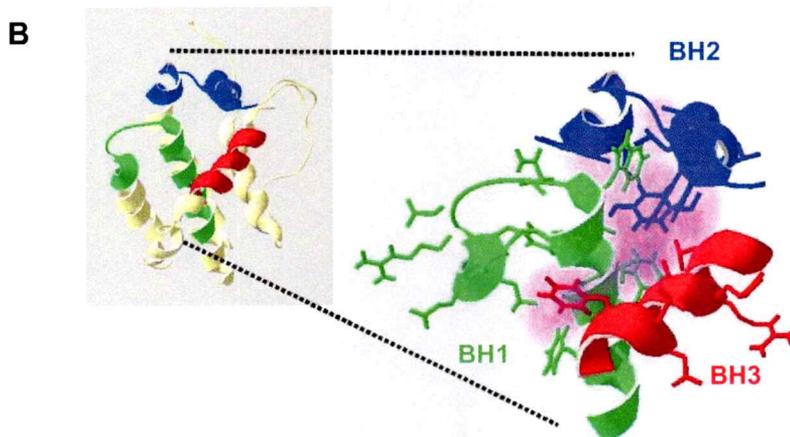
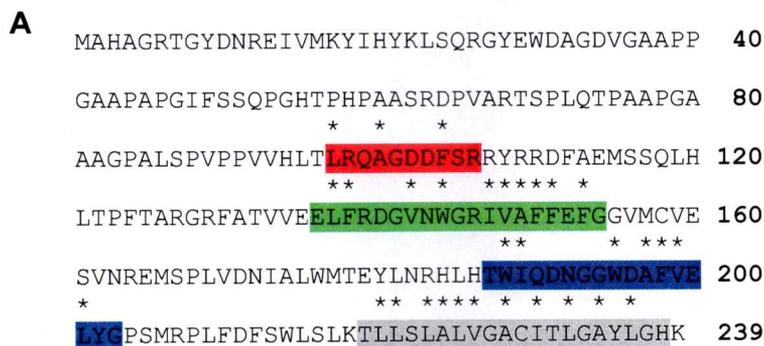


Figura 2. Bolsillo hidrofóbico de Bcl-2.

La obtención de la estructura de Bcl-2 reveló que los dominios BH1, BH2 y BH3 de esta proteína orientan sus aminoácidos apolares hacia un centro común, dando lugar a la formación de un bolsillo hidrofóbico (23). Posteriormente, se determinó que este bolsillo es el sitio de unión del dominio BH3 de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Actualmente se sabe que la hetero-oligomerización entre Bcl-2 y proteínas como Bax y Bid es uno de los mecanismos de regulación funcional de estas proteínas.

A. En la figura se detalla la estructura primaria de Bcl-2. Se destacan en color los residuos aminoacídicos que forman los dominios BH1 (verde), BH2 (azul) y BH3 (rojo). En asterisco (*) se destacan los residuos no polares. Adicionalmente en color gris se destaca el segmento transmembrana de Bcl-2.

B. Detalle del bolsillo hidrofóbico de Bcl-2 formado por las hélices que contienen los dominios BH1 (Azul), BH2 (verde) y BH3 (rojo). En el inserto se detallan los aminoácidos hidrofóbicos que se orientan hacia el interior de la proteína, generando un ambiente altamente hidrofóbico (Sombreado morado), en el cual se une el dominio BH3 de varios miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (23).

La evidencia estructural predice que el dominio BH3 de Bcl-2 y Bax posee una estructura secundaria α helicoidal formada por 10 aminoácidos, 3 de los cuales son residuos no polares que se encuentran orientados hacia el interior de las proteínas cuando éstas se encuentran en solución acuosa (23). Sin embargo, estas observaciones se realizaron en solución acuosa, y no permiten determinar si esta interacción es funcionalmente importante en el contexto de localización intracelular de estas proteínas, dado que se desconoce la conformación estructural que ellas adoptan al estar insertas en el ambiente hidrofóbico de la MME. También es importante hacer notar que la mayoría de los estudios funcionales de Bcl-2 se han ejecutado con versiones truncadas de esta proteína, las que carecen del extremo C-terminal. El motivo de usar esta estrategia de estudio ha sido para facilitar su purificación. Sin embargo se aleja de la condición fisiológica en que Bcl-2 y Bax interaccionan, ya que se desconoce la influencia del extremo C-terminal de estas proteínas en su estructura funcional. En esta tesis se propuso estudiar los determinantes moleculares de la proteína Bcl-2 humana de largo total (Bcl-2) implicados en la inhibición de la liberación del cit c inducida por Bax, en el ambiente lipídico/proteico de la MME.

La estrategia experimental apuntó a definir los requerimientos estructurales de Bcl-2 necesarios para su función en la MME. Para ello se utilizó la capacidad de Bax de promover la liberación del cit c desde mitocondrias aisladas en presencia de Bcl-2 nativa y versiones mutantes en el extremo C-terminal.

Bcl-2 y Bax en la mitocondria

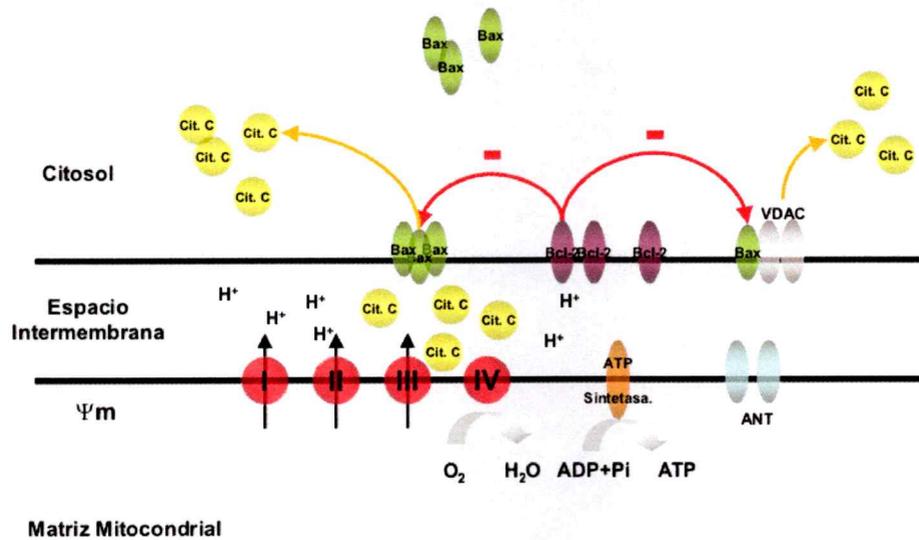


Figura 3. Bcl-2 y Bax en la mitocondria. En este esquema se destacan la distribución celular de Bcl-2 y Bax. Bax en condiciones fisiológicas normales se distribuye en el citosol. Una vez activada, esta proteína se transloca a la membrana de la mitocondria, donde se oligomeriza y posteriormente promueve la liberación del cit. c. Por su parte Bcl-2 se encuentra asociada fuertemente a la membrana mitocondrial, lugar donde inhibe a la salida del cit. c. Hasta el momento el mecanismo mediante el cual Bcl-2 regula la permeabilidad de la mitocondria es desconocido.

Para explorar la participación del dominio BH3 en el mecanismo de acción de Bcl-2 se utilizó las propiedades del inhibidor estructural de Bcl-2, antimicina A₃, compuesto liposoluble que se une al bolsillo hidrofóbico de esta proteína y evita que el dominio BH3 de diferentes proteínas pro-apoptóticas interaccionen con ella.

La combinación de ambas estrategias permitió explorar tanto aspectos moleculares como funcionales de Bcl-2 y Bax, los que en su conjunto podrían revelar el posible mecanismo de acción de estas proteínas en la mitocondria.

HIPÓTESIS

El dominio BH3 y el extremo C-terminal de Bcl-2 participan en el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial

OBJETIVO GENERAL

Definir los requerimientos estructurales de Bcl-2 necesarios para su función en la membrana mitocondrial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes de la familia Bcl-2.
- Demostrar la importancia del extremo C-terminal y del dominio BH3 de Bcl-2 en la inhibición de la salida de citocromo c inducida por Bax.
- Demostrar que Bax y Bcl-2 interaccionan en la membrana mitocondrial, y que esta interacción es importante para la función de ambas proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I Materiales

Ia. Anticuerpos. Todos los anticuerpos se utilizaron según las diluciones recomendadas por los fabricantes.

Tabla 1. Anticuerpos.

Anticuerpo Clon	Marca Número de catálogo	Huésped	Epítope que reconoce el anticuerpo
Citocromo c 7H8.2C12	Pharmingen 556433	Ratón	Citocromo c denaturado
Citocromo c 7H8.2C12	Zymed 33-8500	Ratón	Citocromo c denaturado
Bcl-2 6C8	Pharmingen 551052	Hamster armenio	Bcl-2 recombinante humana
Bcl-2(Δ C21) policlonal	Santa cruz sc-783	Conejo	Aminoácidos 1-205 de Bcl-2 humana
AIF (E-1)	Santa cruz sc-13116	Ratón	Aminoácidos 1-300 de AIF humana
Bcl-2 (100)	Santa Cruz sc-509AC	Ratón	Aminoácidos 41-54 de Bcl-2 humana
Bax (N20) policlonal	Santa Cruz sc-493AC	Conejo	Amino terminal de Bax Humana (IP)
Bax (N20) policlonal	Santa Cruz sc-493	Conejo	Amino terminal de Bax Humana
Anti IgG de ratón	Chemicon Internacional AP124P	Cabra	IgG (H & L)
Cox IV 20E8	Abcam Ab14744	Ratón	Complejo mitocondrial IV purificado bovino

Ib. Reactivos.

Tabla 2. Reactivos

Reactivo	Marca	Número de Catálogo
CHAPS	Calbiochem	220201
Fenilmetilsulfonil Fluoruro (PMSF)	Sigma	P7626
Dnasa I	Sigma	DN-50
Rnasa A	Sigma	R6513
Lisozima	Calbiochem	4403
Tritón x-100	Sigma	T8787
Glicerol	Usbiological	G8145
Carbenicilina	Usbiological	C1100
Cóctel de Inhibidores de proteasas	Sigma	P8465
Isopropil tio- β -D-galactopiranosido (IPTG)	Usbiological	I8500
kanamicina	Gibco	11815-032
Estándar de Peso molecular	Invitrogen	10747-012
Resina de níquel	Qiagen	302010
β mercapto-etanol	Sigma	M7154-250ML

Reactivo	Marca	Numero de Catalogo
Quikchange	Stratagene	200518
Imidazole	Calbiochem	4015
Imidazole	UsBiological	17000
BS3	Pierce	21580
n-Octil- β -D-glucopiranosido (Octilglucósido)	Bioplus	730087
<i>E. coli</i> M15 (pREP 4)	Qiagen	34210

II. Purificación de Bcl-2 y Bax.

En términos generales, para la expresión de Bcl-2 y Bax de largo total (Bcl-2 y Bax respectivamente) se utilizaron las células comerciales *E. coli* M15 (Qiagen). Inicialmente, 50 ml de medio de cultivo LB (NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L) se inocularon con 20 μ l de bacterias e incubados a 37 °C a 220 rpm durante toda la noche. Al siguiente día, 1 L de LB fresco se inoculó con 20 ml del pre-cultivo anterior. El nuevo cultivo fue incubado a 37 °C durante 3 h en condiciones de agitación constante a 220 rpm y a una temperatura de 37 °C, tiempo suficiente para alcanzar una absorbancia de 0,6 UA (λ :600 nm). Posteriormente, la expresión de proteínas se indujo con IPTG (1mM) durante 2 h adicionales.

- **Bcl-2.** Luego de la inducción de la expresión de proteínas, las células se centrifugaron a 6.000 x g por 10 min a 4 °C. El *pellet* de bacterias resultante se resuspendió en tampón de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, PMSF 1 mM, β mercapto-etanol 5 mM, lisozima 1 mg/ml, DNAsa y RNAsa 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y cóctel de inhibidores de proteasas) e incubado en hielo por 1 h. Posteriormente el lisado es sonicado 3 veces por 1 min en hielo (350 W) y centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. El *pellet* de membranas que contiene la proteína se resuspendió en tampón de membranas (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 50 mM, CHAPS 1 %, β mercapto-etanol 5 mM, glicerol 20 %, cóctel de inhibidores de proteasas, pH: 7,2) e incubado en hielo por 30 min. La fracción soluble en CHAPS se sonicó 3 veces por 1 min en hielo (350 W) y centrifugó a 15.000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante es incubado con la resina de Ni-NTA, previamente equilibrada con TM, durante 1 hr a 4 °C con agitación constante. Luego la resina es lavada 3 veces con tampón de lavado (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 50 mM, Tritón X-100 0.5 %, β mercapto-etanol 5 mM, glicerol 20 %, pH: 7,2) seguido se de 3 lavados con tampón de pre-elución (K_2HPO_4 50 mM, imidazol 50 mM, β mercapto-etanol 5 mM glicerol 20 % pH: 7,2). La resina se empacó en una mini-columna a la cual se le adicionó 500 μl de tampón de elución (K_2HPO_4 50 mM, imidazol 250 mM, glicerol 20 % pH: 7,2) y se recolectó la proteína en 5 fracciones de 100 μl .
- **Bax.** Las células se centrifugaron a 6.000 x g por 10 min a 4 °C. El *pellet* de bacterias se resuspendió en tampón de lisis (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM,

imidazol 10 mM, PMSF 1 mM, β mercapto-etanol 5 mM, lisozima 1 mg/ml, DNAsa y RNAsa 350 μ g/ml y cóctel de inhibidores de proteasas) e incubado durante 1 h en hielo. Posteriormente el lisado fue sonicado 3 veces por 1 min en hielo (350 W) y centrifugado a 15.000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se incubó con la resina de Ni-NTA, previamente equilibrada con tampón de lisis, durante 1 h a 4 °C con agitación constante. Luego la resina fue lavada 3 veces con tampón de lavado (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 50 mM, Tritón X-100 0.5 %, β mercapto-etanol 5 mM, pH: 7,2) seguido de 3 lavados con tampón de pre-elución (K_2HPO_4 50 mM, imidazol 50 mM, β mercapto-etanol 5 mM, pH: 7,2). La resina se empacó en una mini-columna a la cual se le adicionó 500 μ l de tampón de elución (K_2HPO_4 50 mM, imidazol 250 mM, pH: 7,2) y se recolectó la proteína en 5 fracciones de 100 μ l.

La cuantificación y grado de pureza de las proteínas purificadas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Mediante el análisis densitográfico se relacionó la intensidad de las bandas obtenidas de las proteínas purificadas con una curva estándar de patrones cantidad conocida de albúmina de suero de bovino (BSA).

III. Mutación del extremo C-terminal Bcl-2.

La estrategia para la generación de mutantes truncadas en el extremo C-terminal de Bcl-2 apuntó a introducir en la secuencia nucleotídica de Bcl-2 tres codones de término, de tal manera de interrumpir la traducción de la proteína de

manera controlada. Para esto, se generaron 2 grupos de partidores complementarios con la secuencia de Bcl-2 que contenían los codones de término, utilizando las indicaciones del fabricante del *kit* comercial *Quikchange* (*stratagene*). Las mutantes de Bcl-2 generadas carecieron de 11 (Bcl-2 Δ C11) ó 21 (Bcl-2 Δ C21) aminoácidos del extremo C-terminal. Para comprobar que los vectores contienen la secuencia correcta, estos fueron purificados y secuenciados.

VI. Liberación del citocromo c.

Se obtuvo una suspensión enriquecida de mitocondrias mediante centrifugación diferencial. El hígado de una rata de 6 semanas se cortó en trozos pequeños y se homogeneizó en tampón de aislamiento de mitocondrias (manitol 220 mM, sacarosa 68 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, BSA 0.1% y cóctel de Inhibidor de proteasas, pH 7,2) hasta que no quedaron trozos. El lisado se distribuyó en tubos de 15 ml, centrifugando a 600 X g por 10 min a 4 ° C, con lo que se obtuvo en el *pellet*, los núcleos y restos celulares. El sobrenadante, que contenía las mitocondrias, fue nuevamente centrifugado a 3.500 x g por 15 min a 4 ° C. Luego el *pellet* de mitocondrias resultante fue resuspendido en 15 ml de tampón de aislamiento de mitocondrias frío y se centrifugó nuevamente a 1.500 x g durante 5 min a 4 ° C con el fin de eliminar los restos de membranas. Este último punto fue repetido 2 veces. Finalmente las mitocondrias se centrifugaron a 5.500 x g por 10 min a 4 °

C. Las mitocondrias fueron resuspendidas en 1 ml de tampón de resuspensión de mitocondrias (KCl 125 mM, EGTA 0.5 mM, succinato 5 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl 5 mM, pH: 7,2) y mantenidas en hielo por 4 h.

Las mitocondrias purificadas (150 µg) fueron incubadas con diferentes concentraciones de Bax por 30 minutos a 37°C. Posteriormente las mitocondrias fueron centrifugadas a 10.000 x g por 10 min y de la fracción soluble se determino presencia del cit c mediante *Western blot*.

V. Inserción de Bcl-2 y Bax en la membrana mitocondrial.

Las mitocondrias tratadas con Bax y Bcl-2 durante los ensayos de liberación del cit c luego de ser centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, fueron incubadas con un tampón alcalino. Éste tratamiento consistente en incubar la fracción de membrana con Na₂CO₃ (pH: 11) durante 10 minutos en hielo. Alternativamente, las membranas fueron incubadas con Na₂HPO₄ de diferentes pH, durante 10 min en hielo. Posteriormente las membranas se solubilizaron en tampón de lisis (NP40 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas). La detección de la presencia de Bax y Bcl-2 se realizó a partir de la fracción soluble mediante *Western blot*.

VI. Entrecruzamiento de proteínas.

Bax purificado fue incubado solo o en presencia de diferentes concentraciones del detergente octilglucósido (n-Octil-β-D-glucopiranósido)

durante 30 min a 37°C en presencia del agente entrecruzante soluble BS³ (0,125 mM). Alternativamente, luego del ensayo de inserción de proteínas en la membrana de la mitocondria, la fracción de membrana que contiene las proteínas fue tratada con el agente entrecruzante soluble BS³ (0,125 mM). Los diferentes oligómeros de Bax y Bcl-2 fueron detectados mediante *Western blot*.

VII. Bicapas Lipídicas planas.

Las propiedades electrofisiológicas de Bax fueron estudiadas en un sistema de bicapas lipídicas planas. Este sistema consiste en una cámara de Delrin[®] con dos compartimentos comunicados por una apertura 150 µm de diámetro, en la cual se aplica una película de lípidos consistente en fosfatidilcolina, cardiolipina y fosfatidil-etanolamina en una proporción 5:3:2 (25 mg/ml). La proteína purificada Bax fue adicionada en un lado de la cámara definido como cis, que correspondería al citoplasma en nuestro sistema virtual. El otro compartimiento se definió como trans. Ambos compartimiento contienen la misma solución de registro (125 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM citrato de sodio y 1 mM EDTA, pH: 7,0). Para la optimización de los registros de canal único se utilizó un amplificador Warner instruments 505B y un convertidor análogo/digital Digidata 1322 (Axon instruments, Inc.). Los datos adquiridos se digitalizaron a 5-10 KHz y filtrados a 1 KHz. El programa utilizado para la adquisición de datos fue el pClamp 8.2 (Axon instruments, Inc.).

VIII. Co-inmuno precipitación.

La estrategia experimental apuntó a capturar el complejo entre Bcl-2 y Bax en la membrana mitocondrial. Para esto las mitocondrias fueron preincubadas con Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 o Bcl-2 Δ C21 durante 10 min a 37 °C, con el fin de promover su asociación con la mitocondria. Posteriormente se adicionó la proteína Bax y se incubó durante 20 min a 37°C para promover su inserción y la liberación de la proteína cit c. A continuación, la suspensión de mitocondrias se centrifugó a 10.000 x g para separar las mitocondrias del medio de incubación. El *pellet* que contiene las mitocondrias fue lavado tres veces con TBS, y resuspendido en buffer de lisis (TBS, NP40 1%, inhibidores de proteasas). El lisado que contiene las proteínas mitocondriales fue posteriormente incubado durante toda la noche con anticuerpos conjugados con agarosa anti-Bcl-2 y anti-Bax. Finalmente la suspensión de anticuerpos fue lavada tres veces con buffer de lisis y resuspendida en 10 ul de tampón de carga.

IX. Estimación de cambios en el potencial de membrana mitocondrial con la sonda fluorescente Rodamina 123.

Los cambios en el potencial de membrana de la mitocondria se estimaron usando la sonda catiónica lipofílica Rodamina 123 (R123), en un equipo Fluoromax 2 según el método descrito por Scaduto y col (31). Básicamente, el fundamento para la utilización de R123 reside en que su distribución en la

mitocondria depende del potencial de membrana de este organelo. Un potencial negativo de membrana genera la acumulación de la sonda dentro de la mitocondria, lo cual produce apagamiento de fluorescencia de la sonda. Por el contrario, la despolarización de la membrana de la mitocondria genera la salida de R123 de este organelo, cambiando sus propiedades espectrales. La longitud de onda máxima de los espectros excitación entre mitocondrias acopladas y mitocondrias desacopladas, corresponde a 495 y 520 nm respectivamente. Por esta razón se utilizó la razón 520/495 para la excitación de la sonda, mientras que la emisión de la sonda se midió a 535 nm. El uso de esta razón de fluorescencia permite obtener una magnitud de cambio mucho mayor que la intensidad de cambio medida a cada longitud de onda, además de proporcionar un método menos sensible a cambios en la concentración de la sonda y en la energía de excitación del fluorímetro.

Mitocondrias aisladas de hígado de rata fueron pre-incubadas en medio de resuspensión de mitocondrias (KCl 125 mM, EGTA 0,5 mM, succinato 5 mM, Na_2HPO_4 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl 5 mM, pH: 7,2) a 37 °C durante 5 min. Posteriormente, las mitocondrias fueron llevadas a un volumen final de 2,5 ml e incubadas con 300 nM de R123 durante 3 min con agitación constante. Luego se registra la razón de fluorescencia basal, tanto de mitocondrias no tratadas, como de mitocondrias tratadas con las proteínas recombinantes. Una vez registrada la razón de fluorescencia basal se agregó CCCP (1 μM), ionóforo de protones que colapsa el potencial de membrana de la mitocondria, lo cual permite determinar la razón mínima de fluorescencia que se esperaría a un

potencial de membrana cercano a 0 mV. La diferencia entre la razón de fluorescencia basal y la obtenida luego de agregar CCCP fue graficada en función de la condición experimental.

RESULTADOS

1. Purificación de Bax y Bcl-2.

Una vez que el proceso de la apoptosis se ha iniciado, Bax es activada, lo cual promueve que esta proteína cambie su distribución citosólica, para anclarse en la MME. La redistribución de Bax en la célula tiene como consecuencia la fuga al citosol de la proteína cit c. No obstante, la presencia de Bcl-2 en la MME, evita que Bax altere la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Para poder comprender el mecanismo de acción y los determinantes moleculares de Bcl-2 involucrados en la regulación de Bax, fue necesario establecer un sistema de expresión y purificación de las proteínas que fuese eficiente y de uso rutinario. El diseño experimental *in Vitro* consistió en inducir la salida del cit c desde mitocondrias aisladas, utilizando la proteína Bax. De este modo se estudió el mecanismo de acción de Bcl-2 y se pudo estudiar los determinantes moleculares implicados en la regulación de la permeabilidad de la MME.

Como primer objetivo, se estableció un sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes. Para lograr este objetivo, fue necesario diseñar una estrategia para obtener inicialmente las proteínas Bax y Bcl-2 de largo total purificadas. Para esto, las secuencias nucleotídicas de las proteínas Bax murina y Bcl-2 humana fueron incorporadas en el vector de expresión pProEX-1 (Figura ANEXO IV). La secuencia de las proteínas se orientó de tal manera que al extremo N-terminal de ambas proteínas se incorporó la secuencia que codifica para 6 residuos de histidina, lo cual permite que el producto de expresión sea

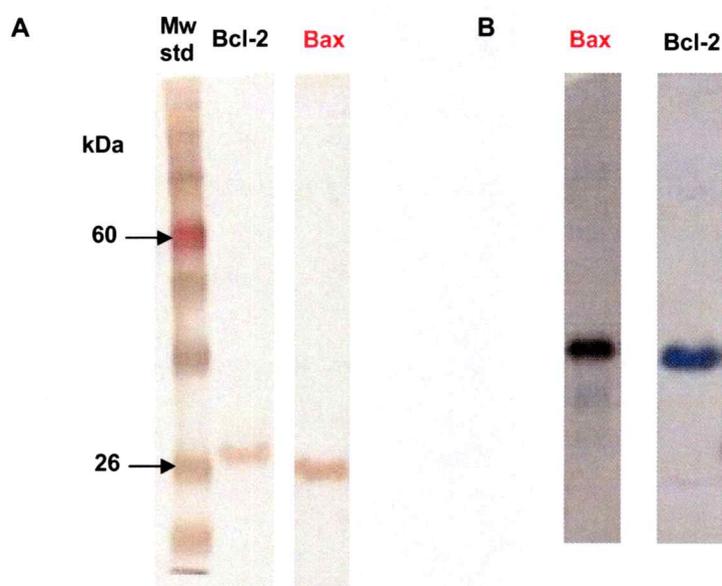


Figura 4. Purificación de Bax y Bcl-2.

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizaron las células *E.Coli* M15, transformadas con el vector pProEX-1/Bax o pProEX-1/Bcl-2, el cual es inducido con IPTG y seleccionado con carbenicilina. Luego de la expresión de proteínas, las bacterias fueron procesadas para iniciar la purificación de las proteínas. El cultivo de células fue centrifugado y el precipitado de células se resuspendió en tampón de lisis, en el que se incubó en hielo por 1 h. Posteriormente el lisado enriquecido en proteínas fue centrifugado para descartar restos celulares, y el sobrenadante fue incubado con la resina de afinidad. Finalmente las proteínas fueron eluidas con imidazol (250 mM).

En la Figura A, se muestra un gel de poliacrilamida (12 %) denaturante teñido con nitrato de plata cargado con Bcl-2 y Bax purificadas (n=20). Se observa la presencia una banda, correspondiente a las proteínas Bcl-2 y Bax según corresponda.

La Figura B es un *Western blot* para la identificación de Bcl-2 humana y Bax de ratón en las fracciones purificadas (n=10).

posteriormente purificado mediante cromatografía de afinidad. Este vector de expresión es seleccionado con carbenicilina, posee la secuencia promotora del operador *lac*, por lo que la expresión de las proteínas se indujo con IPTG. Posteriormente las células comerciales *E.coli* M15 fueron transformadas con el vector de expresión pProEX-1/*Bcl-2* o pProEX-1/*Bax*. La razón por la cual se utilizó esta cepa comercial, fue para asegurar un bajo nivel de expresión basal de las proteínas de interés, ya que contiene el vector pREP4, el que permite la expresión constitutiva de la proteína represora del promotor del operador *lac*. Las células que contienen este vector son seleccionadas con kanamicina, las cuales poseen varias copias del vector pREP4, esto mantiene fuertemente reprimida la síntesis de las proteínas que se encuentran bajo el control del promotor del operador *lac*.

Inicialmente se observó, que la inducción de la expresión de *Bax*, provocó la disminución en la densidad óptica de los cultivos de bacterias (Figura ANEXO V). En el caso particular de *Bcl-2*, la expresión de la proteína no tiene efecto significativo sobre la viabilidad de los cultivos de bacterias.

Sin embargo, el control de la expresión es importante para ambas proteínas, ya que se debe evitar por una parte, que *Bcl-2* se agregue y forme cuerpos de inclusión insolubles, y por otra, que *Bax* induzca la muerte del cultivo, afectando así directamente la recuperación de las proteínas (23).

Ambas proteínas fueron purificadas de manera homogénea con un nivel de pureza >95 % determinado por *SDS-PAGE* teñido con nitrato de plata (Figura

4). El límite de detección reportado para esta técnica se encuentra entre 0,1 a 1,0 ng de proteína por banda (38). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el rango dinámico de detección de la tinción de plata se encontró entre 40 y 400 ng (Anexo I). Rutinariamente, el rendimiento de Bcl-2 fue entre 11 y 20 μg totales. En el caso de Bax se estimó entre 23 y 46 μg totales, siendo la concentración de ambas proteínas purificadas usualmente estimada entre 2 a 10 μM (n=20).

Se concluyó que las proteínas purificadas se obtuvieron en un nivel de concentración y de pureza adecuados para estudiar sus propiedades en ensayos *in vitro*.

Las proteínas mutantes de Bcl-2, Bcl-2 ΔC11 y Bcl-2 ΔC21 se expresaron y purificaron bajo condiciones similares. Sin embargo, la diferencia más significativa se observó en el rendimiento de las proteínas, el cual aumentó con la disminución en el número de aminoácidos del extremo C-terminal. El rendimiento de Bcl-2 ΔC11 fue de $\sim 75 \mu\text{g}$ totales. En el caso de Bcl-2 ΔC21 se estimó entre 100 y 150 μg totales.

Para determinar si Bax, Bcl-2 y sus mutantes purificadas preservan sus propiedades funcionales, se estudió la capacidad de estas proteínas de modular la liberación del cit c desde mitocondrias purificadas.

2. Caracterización funcional de Bax y Bcl-2.

2a. Interacción entre Bcl-2 y la membrana mitocondrial.

Normalmente la proteína Bcl-2 se encuentra distribuida en membranas intracelulares, como la membrana del retículo endoplasmático, la envoltura nuclear y principalmente en la MME (12). Al parecer la presencia de esta proteína en la MME se encuentra estrechamente relacionada con su función anti-apoptótica (17). Por consecuencia, fue investigada la posibilidad que Bcl-2 purificada fuese capaz de interaccionar con la membrana mitocondrial, para lo cual se aislaron mitocondrias de hepatocitos de rata, las que fueron incubadas con varias concentraciones de Bcl-2. La determinación de la presencia de Bcl-2 en la membrana mitocondrial, se realizó mediante *Western blot*, dirigido a la detección de Bcl-2 humana en una fracción enriquecida de membranas. La Figura 5A muestra un *Western blot* para determinar la presencia de Bcl-2 en la fracción de membrana mitocondrial, en el control negativo (C-) no se detecta la presencia de Bcl-2 endógeno, probablemente debido a que los niveles de esta proteína se encuentran por debajo del límite de detección de nuestro ensayo (35). Sin embargo, se observó que Bcl-2 adicionado se asocia a la mitocondria de manera dosis dependiente y claramente la señal se satura a concentraciones mayores que 0,7 μM .

Para discriminar si Bcl-2 interacciona débilmente o fuertemente con la membrana mitocondrial, es decir, mediante interacción electrostática o si se integra en la membrana mitocondrial, las mitocondrias incubadas con Bcl-2 fueron tratadas con Na_2HPO_4 (10 mM) de diferente pH. Esta estrategia permite

alterar las propiedades electrostáticas de la membrana mitocondrial. Si Bcl-2 se asocia de manera electrostática a la membrana mitocondrial, el tratamiento a diferente pH debería debilitar esta interacción (28). La Figura 5B muestra un *Western blot* contra Bcl-2, en el cual es posible detectar la presencia de Bcl-2 purificado luego de haber tratado las mitocondrias con Na_2HPO_4 , ya sea a pH 4,5 ó 11,5. Sin embargo, al comparar la intensidad de Bcl-2 presente en la membrana mitocondrial luego del tratamiento alcalino *versus* el tratamiento con PBS (pH: 7,4), se observa que la cantidad de Bcl-2 unida es levemente mayor en las membranas tratadas con PBS ([Bcl-2]: 1 μM). Estos resultados sugieren que la interacción entre Bcl-2 y la membrana mitocondrial principalmente no es de carácter electrostática, si no más bien de carácter fuerte, probablemente a través de interacciones hidrofóbicas con la membrana mitocondrial o con proteínas integrales en esta membrana.

Éste ensayo funcional demuestra la capacidad de Bcl-2 para interaccionar con la membrana mitocondrial, pero no permite establecer si esta proteína mantiene su capacidad para inhibir la actividad pro-apoptótica de Bax. Por esta razón, se estudio a continuación la funcionalidad de Bax purificado.

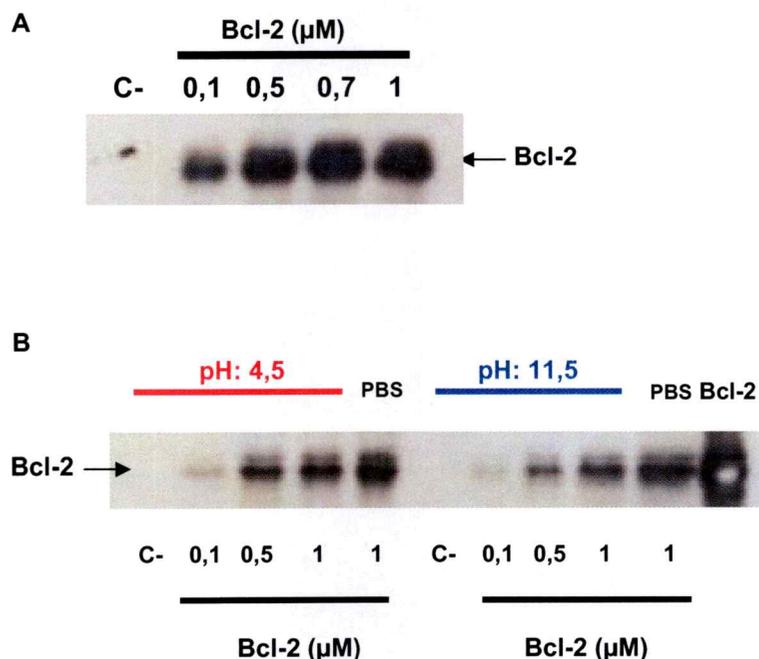


Figura 5. Unión de Bcl-2 a membranas mitocondriales.

Bcl-2 ejerce su función anti-apoptótica en la membrana de la mitocondria, por lo tanto se estudio la capacidad de Bcl-2 recombinante de asociarse con la membrana mitocondrial. Para esto, mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata fueron incubadas con Bcl-2 por 20 min a 37 °C. Luego de la incubación, las mitocondrias se centrifugaron a 10.000 x g por 10 minutos, y el precipitado de membranas resultante fue tratado con tampón alcalino. Éste tratamiento consistente en incubar la fracción de membrana con Na₂CO₃ (pH: 11) durante 10 minutos en hielo para debilitar la interacción débil entre proteínas. Alternativamente, las membranas fueron incubadas con Na₂HPO₄ de diferentes pH, durante 10 min en hielo. Posteriormente las membranas fueron solubilizadas en tampón de lisis (NP40 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas). La detección de la presencia de Bcl-2 se realizó a partir de la fracción soluble mediante *Western blot*. Los resultados presentados corresponden a un *Western blot* en el cual se observa la presencia de Bcl-2 asociada a la membrana mitocondrial.

A. Se determinó y comparó la fracción de Bcl-2 unida a la membrana de mitocondrias incubadas con varias concentraciones de proteína versus mitocondrias no tratadas (C-). (n=3).

B. Al igual que en la figura anterior las mitocondrias fueron incubadas con varias concentraciones de Bcl-2. Posteriormente las membranas fueron tratadas con Na₂HPO₄ (10 mM) a dos pH diferentes (4,5 y 11,5). Se comparó el grado de asociación de Bcl-2 respecto de mitocondrias lavadas con PBS (pH: 7,4). (n=3)

2b. Interacción de Bax con la membrana mitocondrial y liberación del citocromo c.

En una segunda etapa se estudió la funcionalidad de Bax purificada, tanto en su capacidad para unirse a la mitocondria, como en su capacidad para promover la liberación del cit c.

Bax es una proteína que normalmente se encuentra distribuida en el citoplasma de la célula. Sin embargo, frente a un estímulo apoptótico se transloca a la mitocondria, promoviendo la salida del cit c (8, 11). Al igual que Bcl-2, Bax también posee un extremo C-terminal hidrofóbico que permite que esta proteína se integre en la membrana mitocondrial. Por lo tanto, se estudió la capacidad de Bax para asociarse a la membrana mitocondrial y promover la liberación del cit c. Esto se llevó a cabo mediante un ensayo de liberación del cit c desde mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata. Para discriminar si Bax se encuentra adsorbida electrostáticamente a la superficie de la mitocondria o si se encuentra integrada a la membrana mitocondrial, las membranas incubadas con Bax fueron sometidas a un tratamiento alcalino (100 mM Na₂CO₃, pH:11) (28). En el panel superior de la Figura 6A, se muestra un *Western blot* en el cual se detectó la presencia de Bax purificado asociado a la membrana mitocondrial. No fue posible, detectar Bax endógeno mediante ésta técnica (C-). Sin embargo, Bax recombinante se asocia a la membrana mitocondrial. Esta asociación es de carácter fuerte ya que es resistente al tratamiento alcalino. La incorporación de Bax a la membrana de la mitocondria no ocurre de manera

dosis dependiente, más bien parece saturar a concentraciones bajas de Bax, al menos en las condiciones de nuestro ensayo.

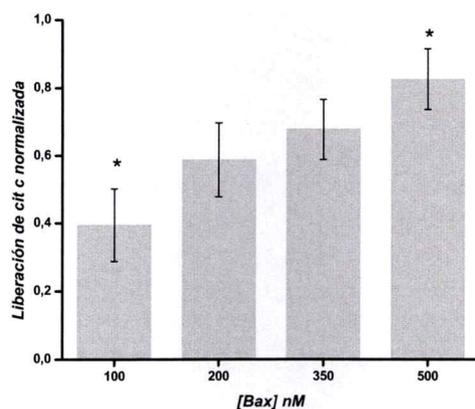
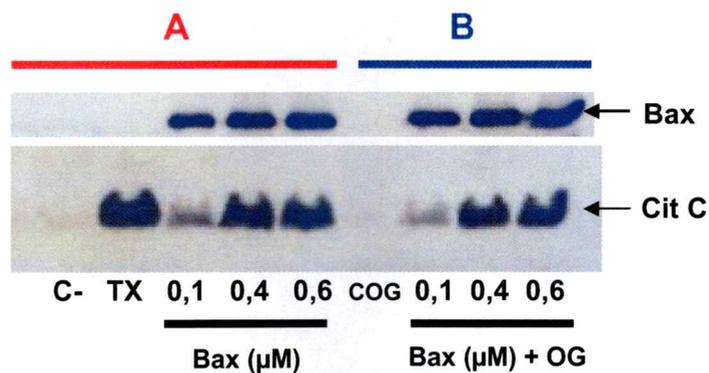


Figura 6. Bax se asocia a la membrana mitocondrial y promueve la liberación de citocromo c.

Mitocondrias aisladas fueron incubadas con varias concentraciones de Bax (A) o Bax incubado con 1% octilglucósido (B). Posteriormente se detectó mediante *Western blot* la unión de Bax a la membrana mitocondrial (panel superior), y de cit c liberado al medio de incubación (panel inferior) inducida por Bax. (n=7)

En el gráfico se resume el efecto de las diferentes concentraciones de Bax sobre la liberación de cit c *in vitro*. * (p < 0.05)

En el panel inferior de la Figura 6A, se observa la liberación basal del cit c (C-) y la máxima en presencia de Tritón X-100 (TX). Bax promueve la liberación del cit c, siendo máxima a partir de una concentración de 0,4 μ M. Estos resultados indican que Bax purificado es funcional, tanto en su capacidad para interaccionar con la membrana mitocondrial como promoviendo la liberación del cit c. Cabe mencionar que Bax purificado se recupera en una forma activa, lo cual difiere de otras preparaciones obtenidas por otros autores, en las que se requiere de la adición de Bid truncado (tBid) o la presencia de detergentes para promover la liberación del cit c (1, 3).

2c. Activación de Bax.

La activación de Bax requiere; primero de un cambio estructural que libere el extremo C-terminal que se encuentra bloqueando el bolsillo hidrofóbico, y segundo la oligomerización e inserción en la membrana de la mitocondria (21, 23, 25). Este cambio conformacional se logra en forma fisiológica presencia de Bid activado (tBid), o de manera artificial en presencia de altas concentraciones de algunos detergentes no iónicos, como por ejemplo octilglucósido (OG, 1). Nuestros resultados demuestran que Bax purificada es suficiente para promover la liberación del cit c desde mitocondrias aisladas (Figura 6A), por lo que nos preguntamos qué hace posible tal efecto. Una de las posibilidades es que Bax purificada se obtuviese en presencia de una proteína contaminante que promoviera su activación. Sin embargo en un total de 20 preparaciones de Bax

no se observó proteínas contaminantes por sobre el límite de detección de la tinción de plata (Figura 4A), lo cual descartaría esta posibilidad. Otra posibilidad es que Bax purificada se encuentre formando oligómeros de manera nativa. En resultados discutidos en el avance anterior se demostró mediante geles nativos que Bax mayoritariamente se obtiene de forma monomérica, sin embargo aproximadamente el 30 % se encuentra formando principalmente dímeros y oligómeros de mayor orden. Paralelamente, en otro grupo de experimentos, se determinó que Bax recombinante principalmente se obtiene como monómero ya que se observó solo una banda de proteína cuando se analiza el *SDS-PAGE* teñido con nitrato de plata (Figura 7A, carril 1). Sin embargo, el *Western blot* contra Bax para este mismo gel, revela que Bax obtenida bajo las condiciones de purificación, forma al menos monómeros y dímeros (Figura 7B, carril 1). Estos resultados sugieren que el tipo de interacción entre monómeros de Bax es de carácter fuerte, probablemente del tipo hidrofóbica, ya que no fue posible romper esta interacción bajo las condiciones denaturantes del gel. Bax purificada se obtiene principalmente de forma monomérica, sin embargo es posible detectar la formación de dímeros bajo condiciones nativas, lo cual podría explicar en parte el efecto de Bax sobre la liberación del cit c desde mitocondrias aisladas.

No obstante, Bax *in vivo* en condiciones de estrés, forma oligómeros de mayor orden (17), lo cual se ha relacionado directamente con la liberación del cit c desde mitocondrias aisladas (11). Con el propósito averiguar si Bax

recombinante posee la capacidad de formar oligómeros, se incubó Bax con diferentes concentraciones de OG

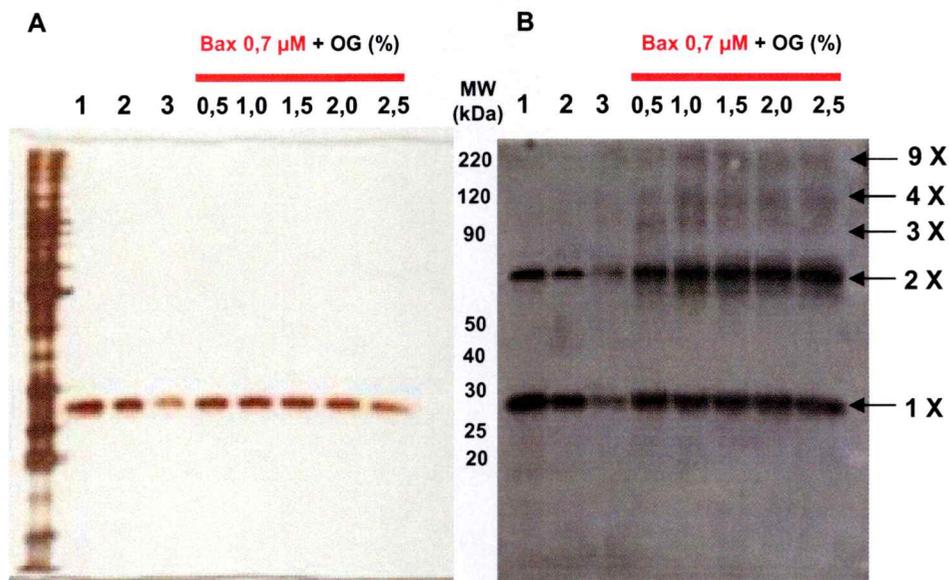


Figura 7. Octilglucósido induce la oligomerización de Bax. Bax purificada se incubó con diferentes concentraciones de octilglucósido en presencia del agente entrecruzante soluble BS³ (0,25 mM).

A: SDS-PAGE tratado con tinción de plata, cargado con Bax (1), Bax dializada (2), Bax + BS³ (3) y con Bax en presencia de diferentes concentraciones de octilglucósido.

B: Western blot realizado para el gel mostrado en A, en el cual se detectó diferentes oligómeros de Bax. (n=6)

por debajo y por sobre la concentración micelar crítica (CMC) descrita para este detergente (~ 1 %), y se capturó las interacciones entre moléculas de Bax en solución mediante el agente entrecruzante soluble, BS³. Los resultados indicaron que no es posible detectar la presencia de oligómeros de Bax mediante *SDS-PAGE* teñido con nitrato de plata, ya sea en ausencia (Figura 7A, carril 3), como en presencia de OG (Figura 7A, Bax 0,7 μ M + OG 0,5-2,5 %). Por el contrario, el *Western blot* contra Bax para el mismo gel, reveló que en ausencia de OG (Figura 7B, carril 3) solo se detectó el monómero y el dímero de Bax. Probablemente, debido a que el *Western blot* posee un límite de detección aproximadamente 1000 veces mayor que la tinción de plata (35, 38). Sin embargo, entre 0,5 y 1,0 % de OG se indujo el enriquecimiento de la banda correspondiente al dímero, y se promovió la formación de trímeros (3x), tetrámeros (4x) y oligómeros de mayor orden (9x). Por sobre la CMC del OG no es posible observar el enriquecimiento de algún complejo en particular, así como tampoco la formación de nuevos oligómeros (Figura 7B, 1,5-2,5% de OG). Estos resultados en conjunto demuestran que Bax purificado es capaz de formar complejos homo-oligoméricos de diferente orden. Por lo tanto, Bax incubado con OG debería promover la liberación del cit c desde las mitocondria con mayor eficiencia. Para explorar este punto, realizamos ensayos de liberación del cit c desde mitocondria purificadas con Bax, proteína que fue previamente incubada con OG (controles Anexo II). En la Figura 6B, se puede

observar en el panel superior que OG (1%) no promueve una mayor asociación de Bax con la mitocondria, respecto a la condición sin detergente (Figura 6A, panel superior). Por otro lado, la Figura 6B (panel inferior) muestra como control, que OG a una concentración máxima de 0,06% no liberó el cit c (COG). Sin embargo, Bax pre-incubado con OG promovió la liberación del cit c, y lo hace de la misma manera que Bax por si sola (Figura 6A, panel inferior). Este resultado sugiere que Bax purificado es suficiente para promover el máximo de liberación del cit c en las condiciones ensayadas. Nuestra evidencia difiere del efecto esperado para el OG, el cual sugería que este detergente potenciaría la acción de Bax. No obstante, el efecto de OG sobre Bax podría ser modificando otras propiedades funcionales de Bax, como por ejemplo la cinética de liberación del cit c. Probablemente, en el tiempo en que se desarrollo el ensayo (30 min) no es posible detectar cambios en los niveles del cit c liberado, por estar ocurriendo a tiempos mucho más cortos. Para investigar esta posibilidad, se estudio el curso temporal, tanto de la unión de Bax a la membrana de la mitocondria, como el de la liberación del cit c (Figura 8).

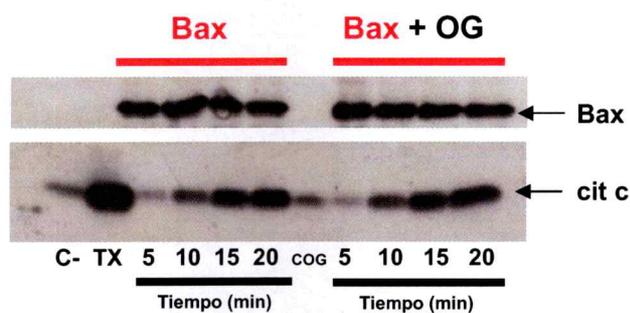


Figura 8. Dependencia temporal de la liberación del citocromo c inducida por Bax.

Para descartar la posibilidad que OG altere la cinética de liberación del cit c, se incubaron a varios tiempos las mitocondrias aisladas, a una concentración fija de Bax ($0,35 \mu\text{M}$), suficiente para promover la liberación del cit c. Inicialmente, se determinó que Bax se asocia a la membrana mitocondrial de manera fuerte (*Western blot* superior), y al parecer esta asociación no depende del tiempo de incubación. Sin embargo, se observa que la salida del cit c inducida por Bax esta directamente relacionada con el tiempo de incubación (*Western blot* inferior). C-: Mitocondrias incubadas con buffer de elución de Bax. TX: Mitocondrias tratadas con Triton X-100 (1%). COG: Mitocondrias incubadas con OG ($5 \times 10^{-2} \%$). (n=3)

Se determino que Bax (0,35 μ M) interacciona rápidamente con la membrana de la mitocondria, y no se observó un aumento en la unión de esta proteína en el tiempo tanto en ausencia como en presencia de OG (Figura 8, panel superior). Sin embargo, la liberación del cit c inducida por Bax (0,35 μ M) es tiempo dependiente (Figura 8, panel inferior). No obstante, el curso temporal observado en ausencia y en presencia de OG es similar. En resumen, Bax se asocia tempranamente a la mitocondria, no detectándose un aumento significativo entre los 5 y 20 minutos de ensayo ni encontrándose diferencia en los niveles del cit c liberado en el tiempo tanto en ausencia como en presencia de OG.

Podemos concluir de esta serie de experimentos, que Bax purificada se obtiene de manera activa, y que es suficiente para promover la liberación del cit c desde mitocondria aisladas, y que mantiene la capacidad de formar oligómeros, lo cual esta en acuerdo con la función pro-apoptótica descrita de Bax.

3. La liberación del citocromo c inducida por Bax es inhibida por Bcl-2 *in vitro*.

Una vez iniciada la apoptosis, Bax se reorganiza dentro de la célula, translocándose hacia la mitocondria en donde promueve la salida del cit c hacia el citoplasma. Por otra parte, Bcl-2 normalmente se encuentra asociada a la membrana externa de la mitocondria, desde donde modula negativamente la liberación del cit c inducida por Bax (11). Nuestros resultados se encuentran en acuerdo con el modelo propuesto, ya que tanto Bcl-2 como Bax interaccionan

de manera fuerte con la mitocondria, y Bax promueve la liberación *in vitro* del cit c. Lo siguiente es demostrar que Bcl-2 ejerce un efecto antagónico sobre la acción de Bax en la mitocondria, evitando que el cit c escape de este organelo. Por lo tanto, se ensayo la capacidad de Bcl-2 purificada para inhibir el efecto permeabilizador de Bax sobre las membranas mitocondriales.

En primer lugar, para incorporar a la membrana mitocondrial la proteína Bcl-2, las mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata fueron preincubadas con varias concentraciones de Bcl-2 (Figura 9).

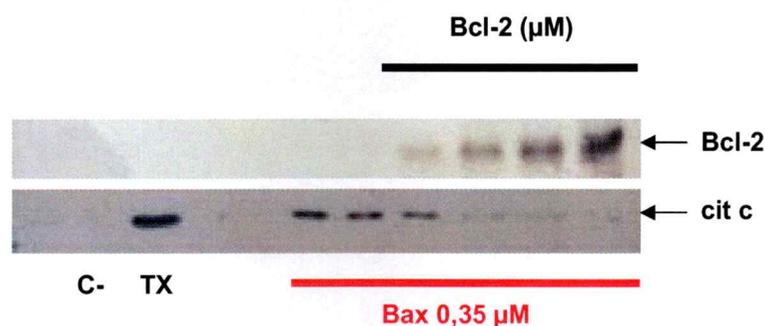


Figura 9. Bcl-2 inhibe la liberación de citocromo c inducida por Bax. Mitocondrias purificadas se preincubaron con diferentes concentraciones de Bcl-2 durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron con Bax (0,35 μM). Panel superior: *Western blot* contra Bcl-2 presente en la membrana mitocondrial. Panel inferior: *Western blot* contra cit c, el cual se detectó desde el medio de incubación de las mitocondrias.

C-: Mitocondrias no tratadas con proteínas. TX: Mitocondrias tratadas con Tritón X-100 (1%) (n=4)

Posteriormente, las mitocondrias pre-tratadas con Bcl-2 fueron incubadas con Bax (0,35 μ M) para promover la liberación del cit c. Bax en ausencia de Bcl-2 promueve la salida del cit c (Figura 9, panel inferior). Sin embargo, la salida del cit c en presencia de Bax y de Bcl-2 (1,5 μ M) se reduce fuertemente. Al mismo tiempo, Bcl-2 se une a la membrana mitocondrial (Figura 9, panel superior). Estos resultados se encuentran en acuerdo con el modelo inicial, en el cual la presencia de Bcl-2 en la membrana mitocondrial es importante para su función anti-apoptótica. Uno de los posibles mecanismos de acción de Bcl-2 es la modulación de la interacción de Bax con la membrana de la mitocondria inhibiendo la formación de poros de Bax. Alternativamente, Bcl-2 previene que Bax se asocie con otros canales endógenos involucrados el transito del cit c hacia el citosol.

4. Interacción de Bcl-2 y Bax con membranas lipídicas sintéticas.

Hasta el momento se ha determinado que Bax promueve la salida del cit c desde mitocondrias aisladas y que Bcl-2 inhibe este evento. Los datos sugieren que estas proteínas se asocian a la membrana de la mitocondria para ejercer su función. La interacción con la membrana mitocondrial es de carácter fuerte ya que ambas proteínas son resistentes al tratamiento alcalino. La interacción de estas proteínas con la MME parece ser clave en el mecanismo de acción de estas. Probablemente, Bax forma poros que permiten la fuga del cit c, o alternativamente modula la apertura de poros presentes en la MME o

simplemente induce la ruptura de ésta, mientras que Bcl-2 regularía esta actividad. Para obtener mayores detalles del mecanismo molecular mediante el cual Bcl-2 y Bax interaccionan con membranas lipídicas, se determinó la capacidad de estas proteínas puras de inducir actividad electrofisiológica en bicapas lipídicas artificiales. Hasta el momento, se han resuelto las estructuras en solución de diferentes miembros tanto anti-apoptóticos como pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (23, 24, 25). Estas son similares a las descritas para porinas bacterianas como colicina E1 y a la subunidad formadora de poros de la toxina de la difteria (44). Esta homología no solo es estructural, ya que tanto Bcl-X_L (19) como diferentes miembros de la familia, como por ejemplo Bax, Bcl-2 y Bid forman poros o canales iónicos en bicapas lipídicas planas (11, 15, 17). Este paradigma es una buena estrategia para estudiar la interacción de Bax y Bcl-2 purificada con las membranas lipídicas. Para esto, Bax y Bcl-2 fueron ensayadas en un sistema electrofisiológico de bicapas lipídicas planas. Las proteínas se adicionan en el compartimiento Cis lo que induce una actividad electrofisiológica caracterizada por fluctuaciones rápidas y relativa baja conductancia, cercana a 150 pS en el caso de Bax (Figura 10A). De manera similar, la adición de Bcl-2 induce fluctuaciones rápidas de la corriente. Esta actividad puede aumentar hasta inestabilizar y romper la bicapa lipídica (Figura 10B). Interesantemente, Bax en presencia de β octil-glucósido forma poros de gran conductancia y alta probabilidad de apertura.

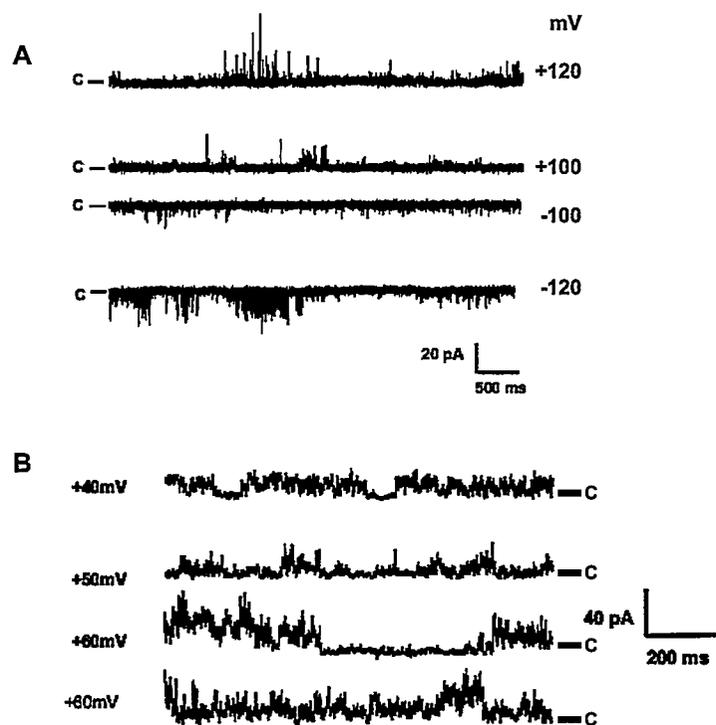


Figura 10. Interacción de Bcl-2 y Bax en membranas lipídicas sintéticas generan actividad electrofisiológica.

A. Actividad electrofisiológica característica de la proteína Bax. Esta actividad se midió a tres voltajes diferentes, + 120, + 100 y - 100 mV. El estado cerrado del canal se representa como C. La conductancia determinada para los canales formados por Bax bajo estas condiciones es de 145 pS.

B. Actividad electrofisiológica característica de la proteína Bcl-2. La adición de la proteína en el compartimiento cis se correlaciona con fluctuaciones en la corriente. Esta actividad se midió a tres voltajes diferentes, + 40, + 50, +60 mV. El estado cerrado del canal se representa como C

Esta evidencia apoyada en la caracterización bioquímica de Bax en presencia del detergente sugiere que, la actividad electrofisiológica observada en estas condiciones es el resultado de la oligomerización de esta proteína en la bicapa sintética (Anexo III).

5. Antimicina A₃ Inhibe la función de Bcl-2 en la membrana mitocondrial.

Se exploró si el dominio BH3 de Bcl-2 es importante en el mecanismo de acción de esta proteína. El modelo actual, se basa en la evidencia observada a partir de la estructura en solución de Bcl-2, la cual sugiere que la inhibición de la liberación del cit c ocurriría mediante un mecanismo que involucra interacción proteína-proteína, esto sería mediante el anclaje del dominio BH3 de Bax en el bolsillo hidrofóbico de Bcl-2. Esta interacción proteína-proteína ocurriría en solución, donde los residuos hidrofóbicos del dominio BH3 de Bax interaccionarían con los residuos aminoacídicos apolares orientados hacia el interior del bolsillo hidrofóbico de Bcl-2. No obstante, la evidencia electrofisiológica sugiere una situación muy diferente, ya que Bcl-2 no solo se inserta en la MME mediante el extremo C-terminal, si no que también mediante sus hélices α 5 y 6, las que tendrían que atravesar la bicapa lipídica para dar cuenta de su actividad como canal de iones (32). Proponemos que Bcl-2 al interaccionar con la membrana mitocondrial, la estructura en solución se reorganiza de manera tal, que las hélices α 5 y 6 se integrarían en la membrana mitocondrial, rompiendo con la estructura del bolsillo hidrofóbico, por lo que la

interacción con Bax ya no sería en solución, si no más bien en el ambiente lipídico de la MME. Para comprobar nuestra hipótesis, bloqueamos la interacción de Bcl-2 con Bax en la membrana mitocondrial con AA,

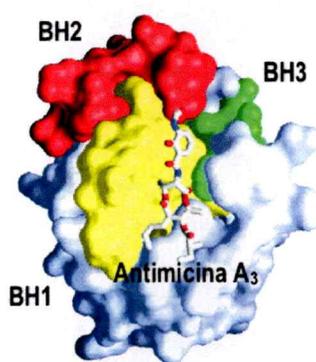


Figura 11. Modelo molecular de Bcl-2 asociada a antimicina A₃.
La figura representa la estructura de la proteína Bcl-2, en la que se detalla en colores los residuos expuestos de los dominios BH1 (Amarillo), BH2 (Rojo) y BH3 (Verde), que dan lugar a la formación del bolsillo hidrofóbico. En esta estructura se muestra el sitio de interacción del inhibidor estructural de Bcl-2, antimicina A₃, molécula que se une al bolsillo hidrofóbico de Bcl-2. El mecanismo de acción de este inhibidor sería bloqueando la unión al bolsillo hidrofóbico del dominio BH3 de diferentes proteína pro-apoptóticas de la familia Bcl-2.
(10)

inhibidor estructural de Bcl-2, molécula que se unen al bolsillo hidrofóbico de Bcl-2 en solución (10, Figura 11).

Se ensayó la capacidad de AA para inhibir la función de Bcl-2 en la membrana de la mitocondria. Para esto, se determinó mediante *Western blot* los niveles del cit c liberado por Bax desde mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata, las que fueron pre-incubadas con Bcl-2 y con diferentes concentraciones de AA. Los resultados muestran que Bax (0.35 μM) es suficiente para promover la liberación del cit c desde mitocondrias aisladas, no obstante, las mitocondria pre-incubadas con Bcl-2 (1 μM), parecen no liberar cit c en respuesta a la adición de Bax (Figura 12 A).

Lo anterior contrasta con los resultados observados si en el ensayo además las mitocondrias son pre-incubadas con AA. Se encontró que entre 0.1 y 1.0 μM de AA, se suprime la actividad inhibitoria que ejerce Bcl-2 sobre Bax, ya que los niveles del cit c liberados son comparables con los observados en presencia de Bax solamente (Figura 12 A). El efecto bloqueador de AA sobre la actividad de Bcl-2 podría deberse simplemente, a que este compuesto evitaría que Bcl-2 interactúe con la membrana de la mitocondria. Para descartar esta posibilidad, se determinó de forma paralela la fracción de Bcl-2 y de Bax presentes en la membrana mitocondrial luego del ensayo, ya sea en ausencia o en presencia de AA. Se observó que, tanto Bcl-2 (Figura 12 B, panel superior) como Bax (Figura 12 B, panel inferior) permanecen asociadas a la membrana de la mitocondria luego del tratamiento alcalino con Na_2CO_3 (100 mM, pH:11), por lo que se concluyó también, que la interacción de Bax con la membrana

mitocondrial no es afectada por la presencia de Bcl-2. AA tampoco altera la capacidad de Bcl-2 y de Bax para asociarse a la membrana mitocondrial, ya que los niveles de ambas proteínas son similares a los encontrados en ausencia de AA (Figura 12 B).

Estos resultados en su conjunto sugieren que AA actúa suprimiendo la interacción entre Bcl-2 y Bax en el ambiente lipídico de la membrana mitocondrial, probablemente bloqueando el bolsillo hidrofóbico de Bcl-2 evitando así el anclaje del dominio BH3 de Bax.

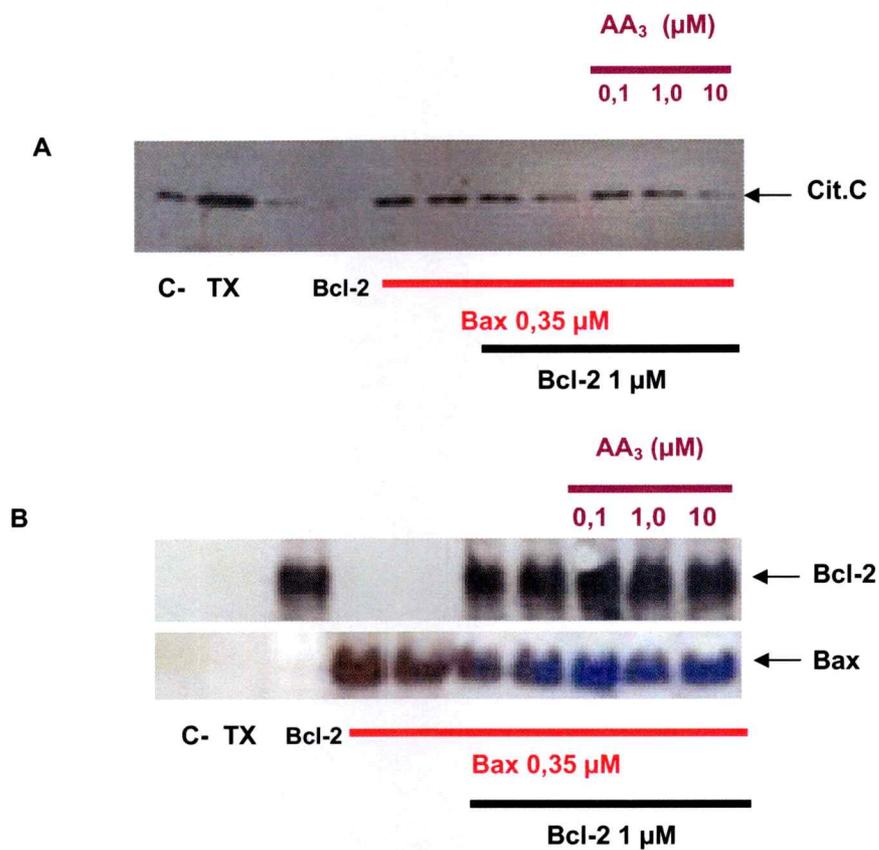


Figura 12. Antimicina A₃ inhibe la función de Bcl-2 en al membrana mitocondrial. Se determinó mediante *Western blot* el cit c liberado en el sobrenadante (**A**) y la fracción de Bcl-2 y Bax unida a la membrana de la mitocondria (**B**). AA a una concentración entre 0,1 y 1,0 μM inhibe el efecto de Bcl-2 sobre la liberación de cit c inducida por Bax (**A**), sin embargo AA no evita que ambas proteínas se asocien a la membrana mitocondrial (**B**). (n=2)

6. Papel del extremo C-terminal de Bcl-2 en la interacción con la membrana mitocondrial.

Diversos miembros tanto anti-apoptóticos como pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 poseen un extremo C-terminal altamente hidrofóbico que sería el responsable de la distribución de estas proteínas en membranas intracelulares (5, 20). Este segmento transmembrana (TM) está formado por al menos 18 aminoácidos los que en su mayoría son no polares. Particularmente, el extremo C-terminal de Bcl-2 está formado por 21 residuos, los cuales 11 son no polares (Figura 2 A, Figura 13).

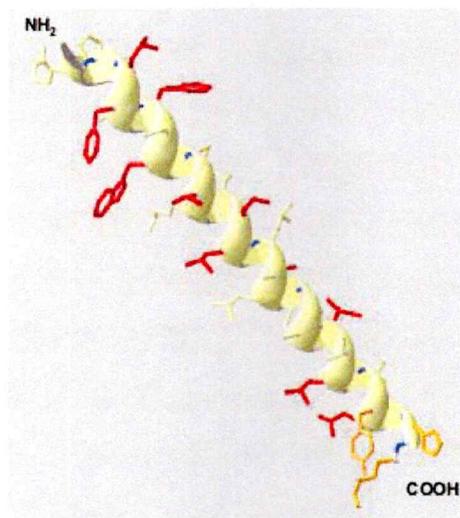


Figura 13. Extremo C-terminal de Bcl-2. La figura se representa en detalle los aminoácidos que conforman el extremo C-terminal de Bcl-2. Este segmento transmembrana está compuesto en su mayoría por residuos apolares. La estructura propuesta para este segmento de la proteína en el ambiente lipídico de la membrana mitocondrias sería una α hélice (14, 42, 46).

En el caso de Bax y de Bcl-w, el extremo C-terminal se encuentra oculto en el bolsillo hidrofóbico, protegido por el extremo N-terminal lo cual las mantiene de manera inactiva en el citosol (6, 24). Sin embargo una vez iniciado el proceso apoptótico, t-Bid promueve un cambio conformacional de Bax que expone el TM e induce la translocación de Bax a la membrana mitocondrial externa. Algo similar ocurre con Bcl-w, ya que el dominio BH3 de miembros de la familia que solo tienen el dominio BH3 (BH3 only), compiten con el extremo C-terminal de Bcl-w por ocupar el bolsillo hidrofóbico, lo cual expone al medio acuoso el extremo C-terminal permitiendo la asociación de Bcl-w a la MME (23). Bcl-2 en condiciones fisiológicas normales se encuentra asociada a membranas intracelulares, como la envoltura nuclear, la membrana externa de la mitocondria y en la membrana del RE (11). En términos funcionales, Bax en la membrana mitocondrial promueve la salida de factores pro-apoptóticos, mientras que Bcl-2 inhibe este proceso. Sin embargo, se desconoce con precisión el mecanismo molecular mediante el cual Bcl-2 y Bax se comunican en la membrana mitocondrial para regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Con la finalidad de determinar el papel del TM de Bcl-2 en la regulación de liberación del cit c inducido por Bax, se diseñaron dos mutantes de Bcl-2, una de ellas carece de 11 residuos del extremo C-terminal (Bcl-2 Δ C11), lo cual representa la mitad de este segmento, y la segunda carece completamente del extremo C-terminal (Bcl-2 Δ C21). El criterio para elegir estas mutantes fue basado en el espesor de la membrana de la mitocondria y en el largo del extremo C-terminal de Bcl-2. Si asumimos que el espesor de la MME

se encuentra entre 30 y 50 Å, y que el extremo C-terminal de Bcl-2 posee una estructura α helicoidal (15, Figura 13), este debería tener una longitud de 31 Å. Dada estas dimensiones, esperaríamos que Bcl-2 Δ C11 se asociara de manera lábil a la MME y que Bcl-2 Δ C21 no se asociara del todo con esta membrana (Ver modelo en la Figura 14). Para esto fue necesario generar y purificar ambas mutantes de Bcl-2. Tanto Bcl-2 Δ C11 como Bcl-2 Δ C21 fueron expresadas en un sistema heterólogo y purificadas mediante cromatografía de afinidad en condiciones de pureza y concentración adecuados para realizar los ensayos de liberación del cit c (Figura 15). Inicialmente, se ensayo la capacidad de ambas mutantes para insertarse en la membrana de la mitocondria. Para esto se incubo mitocondrias purificadas de hígado de rata con diferentes concentraciones de las proteínas recombinantes purificadas (10 min, 37°C). Luego del ensayo, la fracción de membranas de la mitocondria fue sometida a tratamiento alcalino (100 mM Na₂CO₃, pH: 11) para remover interacciones inespecíficas con las membranas, determinándose mediante Western blot la presencia de Bcl-2. Los resultados obtenidos indican que al igual que Bcl-2, las mutantes Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 se asocian a la membrana mitocondrial, ya que luego del tratamiento alcalino es posible detectar la presencia de estas en la fracción de membranas mitocondriales. La unión de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 a la membrana de las mitocondrias ocurre de manera dosis dependiente (Figura 16). Interesantemente, estos resultados discrepan de lo esperado para estas mutantes, ya que al eliminar residuos del segmento TM de Bcl-2 el grado de

asociación esperado de esta proteína con la membrana de la mitocondria debería ser menor.

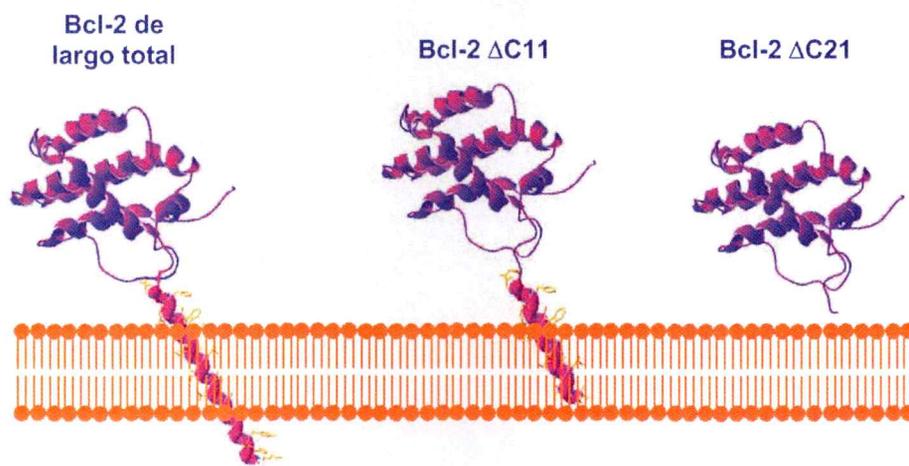


Figura 14. Modelo de inserción de Bcl-2 y mutantes en el extremo C-terminal.

En el esquema se presenta el modelo de inserción de Bcl-2 en la membrana lipídica. En el caso de la proteína de largo total, el extremo C-terminal atravesaría la bicapa lipídica, mientras que se espera para la mutante Bcl-2ΔC11 que el extremo C-terminal sólo se inserte parcialmente, dejando la proteína débilmente asociada a la membrana. La asociación de Bcl-2ΔC21 con la membrana de la mitocondria se espera que sea nula o de muy baja afinidad, ya que se ha removido el segmento trans-membrana putativo (46).

Al remover 11 residuos el segmento TM de Bcl-2 este se acorta en 15 Å, si se considera que este segmento se comporta como una α hélice en la bicapa (Figura 13, 14). Por esta razón, la interacción de Bcl-2 Δ C11 con la membrana de la mitocondria seria solo con una de las hojas de la bicapa lipídica, esto es si consideramos que el espesor de una membrana lipídica es ~ 30 Å. Utilizando el mismo criterio, Bcl-2 Δ C21 no debería insertarse en la membrana de la mitocondria. Estos resultados muestran por primera vez que la inserción de Bcl-2 en la membrana de la mitocondria no depende del segmento TM.

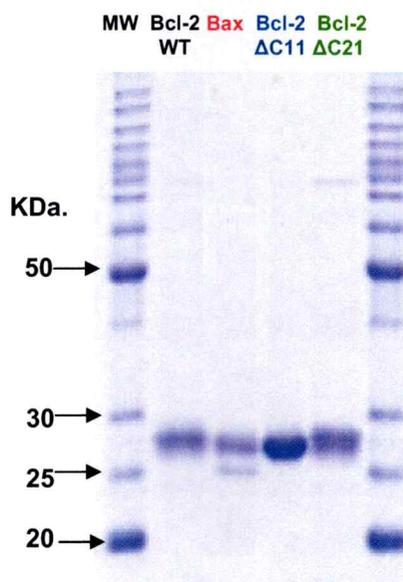


Figura 15. Purificación de mutantes de Bcl-2.

Gel de poliacrilamida denaturante (SDS) 12% cargado con proteínas de la familia Bcl-2 purificadas. Bcl-2 de largo total (Bcl-2WT), Bax de largo total (Bax), Mutante de Bcl-2 que carece de 11 aminoácidos del extremo c terminal (Bcl-2ΔC11) y mutante de Bcl-2 que carece de 21 aminoácidos del extremo c terminal (Bcl-2ΔC21). n= 10

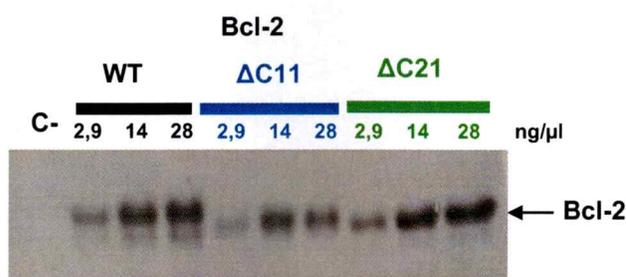


Figura 16. Bcl-2 ΔC11 y Bcl-ΔC21 se integran a la membrana mitocondrial.

Estudiamos la capacidad de Bcl-2 y mutantes de esta proteína en el extremo C-terminal de interactuar con la membrana mitocondrial. Esperamos que en ausencia parcial o total del extremo C-terminal, la capacidad de Bcl-2 de interactuar con la membrana mitocondrial disminuya. Para explorar nuestra hipótesis, mitocondrias aisladas de rata fueron incubadas con diferentes concentraciones de proteínas purificadas, Bcl-2, Bcl-2ΔC11 y Bcl-2ΔC21, durante 20 min a 37 °C. Posteriormente las mitocondrias fueron centrifugadas y sometidas a tratamiento alcalino (100 mM Na₂CO₃, pH: 11) para reducir la interacción inespecíficas de las proteínas con la MME, Posteriormente se detecto la presencia de Bcl-2 y sus diferentes mutantes mediante *Western blot*. Los resultados muestran que tanto Bcl-2 como Bcl-2ΔC11 y Bcl-2ΔC21 permanecen fuertemente asociada a la membrana mitocondrial, lo cual sugiere que el extremo C-terminal de Bcl-2 no se requiere para su inserción en la mitocondria. (n = 9)

7. Papel del extremo C-terminal en la función de Bcl-2 en la membrana mitocondrial.

Los resultados que demuestran la interacción de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 con la membrana mitocondrial aportan datos nuevos sobre el papel del extremo C-terminal de Bcl-2. Los resultados *in vitro* sugieren que Bcl-2 no requiere de un factor presente en el citosol para asociarse a la membrana mitocondrial. No obstante, no se descartó la posibilidad que proteínas presentes en la membrana de la mitocondria ayuden a promover su inserción en la mitocondria.

Si bien, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 poseen la capacidad de asociarse a la mitocondria, desconocemos si estas proteínas son funcionales, es decir, si retienen la capacidad de inhibir la acción de Bax. Por esta razón, se diseñaron experimentos para explorar la funcionalidad de estas mutantes en nuestro sistema *in vitro* de liberación del cit c. Para estudiar la importancia funcional del segmento TM de Bcl-2, ensayamos la capacidad de Bcl-2 Δ C11 y de Bcl-2 Δ C21 de inhibir la liberación de factores pro-apoptóticos, como cit c y del factor inductor de apoptosis (AIF) cuando es inducida por Bax, desde mitocondrias aisladas de hígado de rata. Adicionalmente, quisimos investigar si dentro del mecanismo de acción de Bcl-2 se requiere que esta proteína interaccione con Bax en la membrana de la mitocondria. Para esto, utilizamos en el ensayo de liberación el agente entrecruzante soluble BS³, con lo cual se preservarían las interacciones proteína-proteína que ocurren durante el ensayo de liberación del cit c. Con esta combinación de estrategias experimentales esperamos determinar, por una parte sí el extremo C-terminal de Bcl-2 se requiere para la

inhibición de Bax, y si esta inhibición depende de la interacción proteína-proteína.

Para tener una visión completa del significado de los resultados, se discute cada etapa experimental paso a paso.

Inicialmente, ensayamos la capacidad de las mutantes de Bcl-2 de inhibir la salida del cit c inducida por Bax. Encontramos que Bcl-2 inhibe la salida del cit c inducida por Bax, es decir, al comparar la fracción del cit c liberado desde mitocondrias incubadas con Bax, es significativamente diferente a la fracción del cit c liberado cuando a las mitocondrias son pre-tratadas con Bcl-2 (Figura 17A). Sorpresivamente, Bcl-2 Δ C11 se comporta de manera similar a Bcl-2, ya que no se observa diferencia significativa en la fracción del cit c. Por el contrario, Bcl-2 Δ C21 no inhibe el efecto de Bax, ya que la fracción del cit c liberado no es significativamente diferente a la observada en presencia solo de Bax (Figura 17B). Para este grupo de experimentos, se esperaba que tanto Bcl-2 Δ C11 como Bcl-2 Δ C21 fueran insuficientes para inhibir la función de Bax, ya que según la hipótesis de trabajo, algunos aminoácidos de este segmento de Bcl-2 estarían funcionalmente involucrados en la regulación de Bax. Solo la proteína Bcl-2 Δ C21 no inhibe a Bax, lo cual sugiere que el extremo C-terminal de Bcl-2 es una pieza clave en el mecanismo molecular de regulación de la permeabilidad de la mitocondria. Posiblemente, el extremo C-terminal de Bcl-2 interactúa directamente, o a través de una proteína accesoria, con dominios de Bax que se encuentran dentro de la bicapa lipídica y que son importantes para la formación de un poro que deje escapar cyt c.

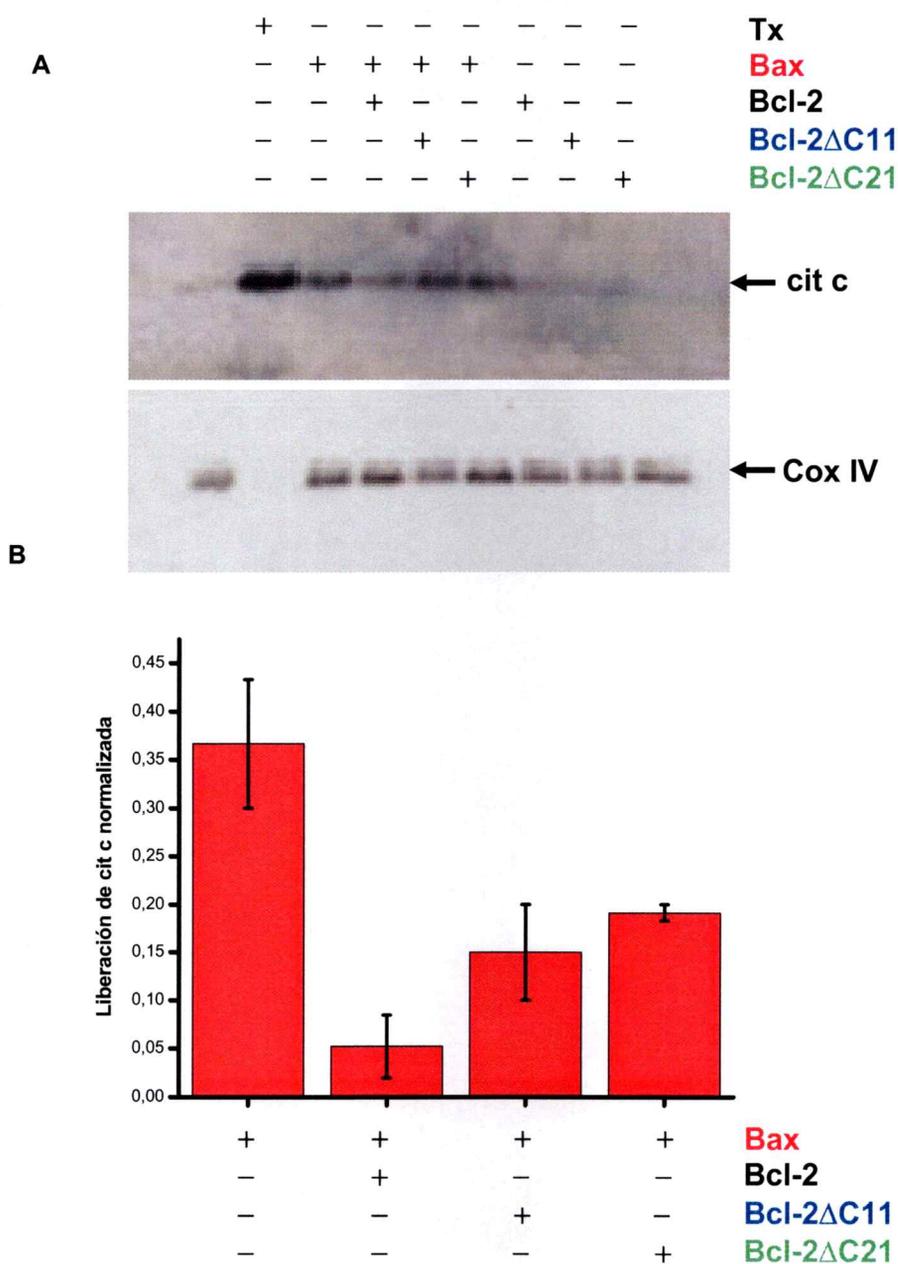


Figura 17. Papel funcional del extremo C-terminal de Bcl-2.

La salida del cit c desde la mitocondria es un evento que inicia una cascada de activación de proteínas que culmina con la muerte celular. La función principal de Bcl-2 en la MME es evitar que se libere el cit c. Estudiamos el efecto funcional que tiene remover varios aminoácidos del extremo C-terminal de Bcl-2. Para esto, se ensayo la capacidad de inhibir la salida del cit c inducida por Bax de dos mutantes de Bcl-2, a las cuales se les removió 11 (Bcl-2ΔC11) y 21 (Bcl-2ΔC21) aminoácidos del extremo C-terminal.

A. *Western blot* representativo del efecto sobre la liberación de cit c inducido por Bax (350 nM) en presencia Bcl2, Bcl-2ΔC11 y Bcl-2ΔC21 (14, 28 ng/μl). Panel superior se observa la detección de cit c liberado durante el ensayo. Panel Inferior corresponde COX IV, control de carga del ensayo (n = 4). **B.** Gráfico del efecto funcional de la remoción de 11 y 21 aminoácidos del extremo C-terminal de Bcl-2. (* p<0,05)

Por otro lado, la detección de Bax en la fracción de membrana de mitocondria luego del ensayo de liberación del cit c, demuestra que Bax además de encontrarse asociada a la membrana de la mitocondria de manera monomérica, también una fracción de ella se encuentra de forma dimérica (Figura 18A). La presencia del agente entrecruzador BS³ en la ultima etapa del ensayo, permite estabilizar mediante enlaces covalentes los complejos proteicos establecidos durante el ensayo, este caso entre moléculas de Bax. Si bien es cierto la interacción entre proteínas puede ser inespecífica, solo se observa en el *Western blot* contra Bax (Figura 18A) un bandeo correspondiente a los pesos moleculares del monómero (~ 23 kDa) y de el dímero (~ 46 kDa). Esto sugiere interacción entre moléculas de Bax, las cuales estarían interaccionando en la membrana mitocondrial, ya que esta se encuentra presente en la fracción proteínas de membrana mitocondrial resistente al tratamiento alcalino. No obstante en este experimento no es posible discriminar entre un homodímero de Bax o un heterodímero entre una molécula de Bax y otra de Bcl-2 ya que el peso molecular de este homodímero es cercano a los 49 kDa. y el limite de resolución del gel de poliacrilamida (12%) no permite discriminar una diferencia de 3 kDa. Para poder discriminar entre estas dos posibilidades una estrategia que exploramos en etapas posteriores de esta tesis, involucra ensayos de co-inmuno precipitación de Bax y Bcl-2.

En términos funcionales Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 no evitan que Bax se inserte en la membrana de la mitocondria, sin embargo Bcl-2 Δ C21 no inhibe

significativamente la liberación del cit c inducida por Bax respecto a la proteína Bcl-2 (Figura 17 B)

Los resultados obtenidos también muestran que Bax no induce la salida desde la mitocondria de AIF (Figura 18C), lo cual sugiere que su efecto es específico, por lo que la salida del cit c observada corresponde a un evento regulado y no a la perdida inespecífica de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Adicionalmente, con el fin de demostrar la homogeneidad en la cantidad de proteínas cargadas en los geles se utilizó como control de carga la proteína citocromo c oxidasa (COX IV). Esta proteína es un buen control para proteínas de membrana de la mitocondria, sin embargo solo representa un control indirecto para las proteínas liberadas desde la mitocondria (Figura 18E).

Los resultados obtenidos a partir del comportamiento de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 en el sistema *in vitro* permiten postular que en el mecanismo de inserción de Bcl-2 podría jugar un papel importante los aminoácidos presentes en la ultima porción del extremo C-terminal de Bcl-2 Δ C21, es decir, el extremo C-terminal de Bcl-2 seria más largo de lo que hasta el momento se piensa. Alternativamente, otros segmentos de Bcl-2 tendrían participación en la inserción en la membrana lipídica. Las α hélices 5 y 6 parecen ser candidatas ideales, ya que se ha postulado que estas serian los dominios putativos que formarían parte del poro proteico que explicaría su actividad electrofisiológica en bicapas lipídicas planas (32, Figura 10). La posibilidad que una proteína presente en la MME facilite la inserción de Bcl-2 no se descarta. Sin embargo,

parece ser que el extremo C-terminal de Bcl-2 no participa en este mecanismo, si no más bien otros dominios de la proteína.

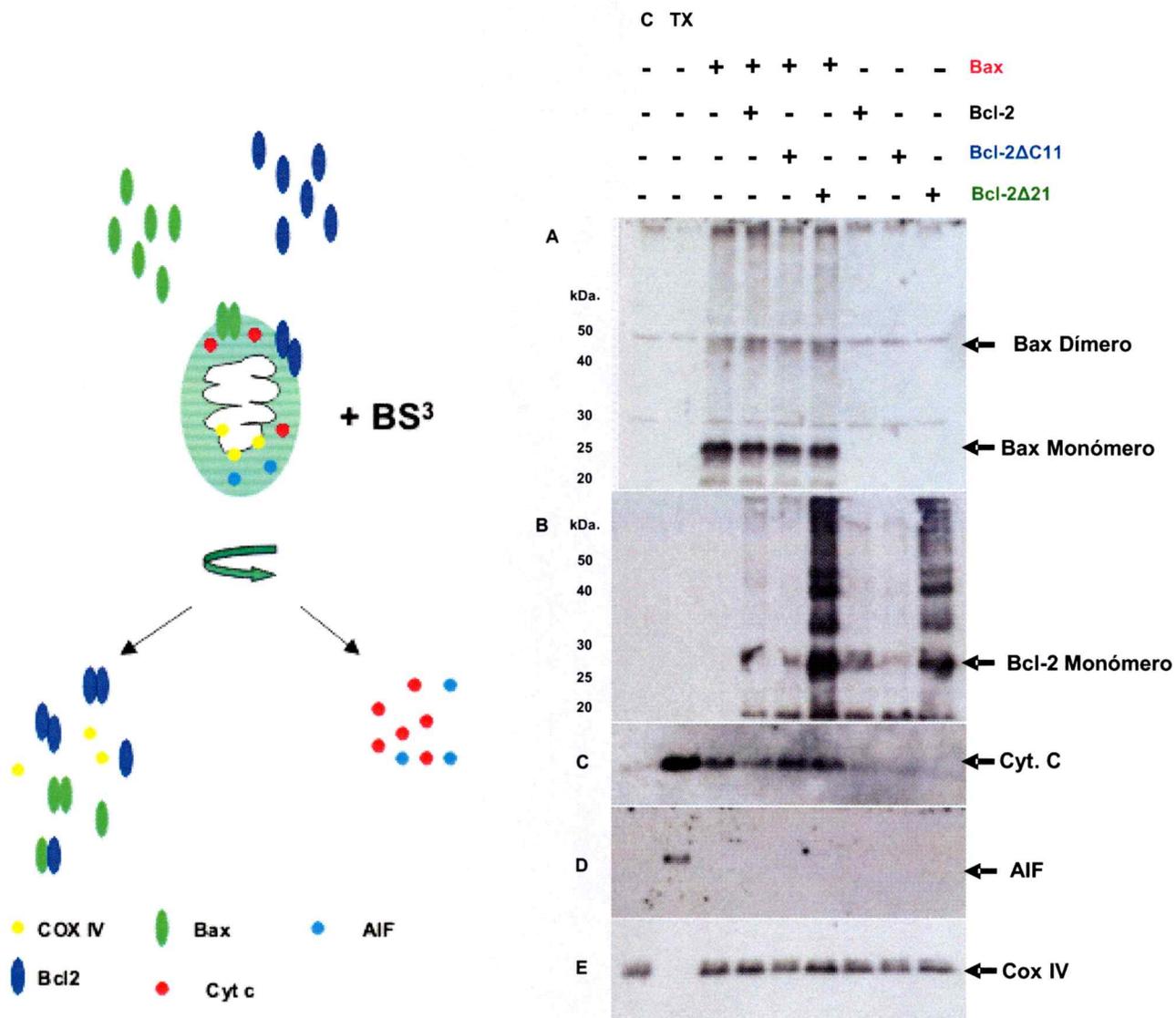


Figura 18. Papel del segmento TM de Bcl-2 en la regulación de la liberación de factores pro-apotóticos inducida por Bax. En el esquema (izquierda) se representa el diseño experimental. Mitochondrias aisladas de hígado de rata se incubaron con Bax y Bcl-2 o Bcl-2ΔC11 o Bcl-2Δ21. Luego del ensayo las mitochondrias se centrifugaron y el sobrenadante se separó del pellet. El sobrenadante contiene las proteínas liberadas de la mitochondrias (cit c, AIF), mientras que el pellet de membrana contiene las proteínas que se asociaron a ella durante el ensayo (Bcl-2, Bax). Posteriormente el pellet se incubó con el agente antecruzante BS³. La presencia de Bax, Bcl-2 en las membranas de mitochondrias, así como también la presencia de cit c y AIF en el sobrenadante se llevo a cabo mediante *western blot*. La proteína COX IV se utilizó como control de carga (n=3).

8. Interacción entre Bcl-2 y Bax en la membrana mitocondrial, ensayo de co-inmunoprecipitación.

Uno de los mecanismos aceptados de regulación de la actividad de las proteínas de la familia Bcl-2 es la interacción proteína-proteína entre miembros anti y pro-apoptóticos. En este modelo, la actividad de Bcl-2 sería secuestrar a Bax, evitando que esta proteína libere el cit c. No obstante, la capacidad de Bcl-2 de inhibir a Bax estaría limitada por el número de moléculas de Bcl-2 presentes en la MME, ya que un número mayor de moléculas de Bax se traduciría en la salida al citosol del cit c.

Hasta el momento se ha demostrado que Bax y Bcl-2 se asocian a la membrana mitocondrial (Figuras 8 y 16 respectivamente), y en el caso de Bcl-2, esto ocurre independientemente de la presencia del extremo C-terminal. Sin embargo, estos ensayos no permitieron determinar si ambas proteínas interactúan en la membrana mitocondrial, y si esta posible interacción depende de la presencia del extremo C-terminal de Bcl-2. Para responder estas preguntas, se estudió la interacción de Bax y Bcl-2 en la membrana mitocondrial mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Para esto, mitocondrias aisladas de hepatocito de rata se pre-incubaron con Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 o Bcl-2 Δ C21, y posteriormente se incubaron con Bax, para inducir finalmente la interacción de estas proteínas en la MME. Luego las mitocondrias tratadas con las proteínas se incubaron en condiciones nativas con anticuerpos anti-Bcl-2 o anti-Bax asociados con agarosa, lo cual permitió recuperar mediante una centrifugación simple en el *pellet*, el complejo Bax/Bcl-2.

Inicialmente se realizó un control negativo con el objetivo de descartar la posibilidad que Bcl-2 y/o Bax endógenos fueran inmunoprecipitados junto a las proteínas recombinantes. Este control consistió en inmunoprecipitar Bcl-2 y Bax desde la fracción de membranas de mitocondrias incubadas en ausencia de proteínas recombinantes. De igual manera se llevo a cabo el control positivo de la técnica, el cual se realizó se realizó incubando las mitocondrias aisladas con las proteínas recombinantes, para luego inmunoprecipitar las proteínas recombinantes desde la fracción de membrana con los anticuerpos contra las mismas proteínas con que fueron incubadas.

Los resultados del control negativo sugieren la ausencia de Bcl-2 (Figura 19A, carril c) y de Bax (Figura 19B, carril c) en las muestras inmunoprecipitadas. Posiblemente, la técnica no permitió detectar la presencia de Bax o Bcl-2 endógeno en las mitocondrias inmunoprecipitadas, debido a que estas proteínas se encuentran en baja cuantía en la MME. Por el contrario, los resultados del control positivo de la técnica, indicaron la presencia de Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 en la fracción de membrana inmunoprecipitada con anticuerpos anti-Bcl-2 (Figura 19A, Ip α Bcl-2). De igual manera, se detectó la presencia de Bax en la fracción de membrana inmunoprecipitada con anticuerpos anti-Bax (Figura 19B, Ip α Bax). Estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales es posible recuperar y detectar específicamente la presencia de las proteínas recombinantes desde la membrana mitocondrial. Dadas las condiciones experimentales, se determinó si Bax interacciona con

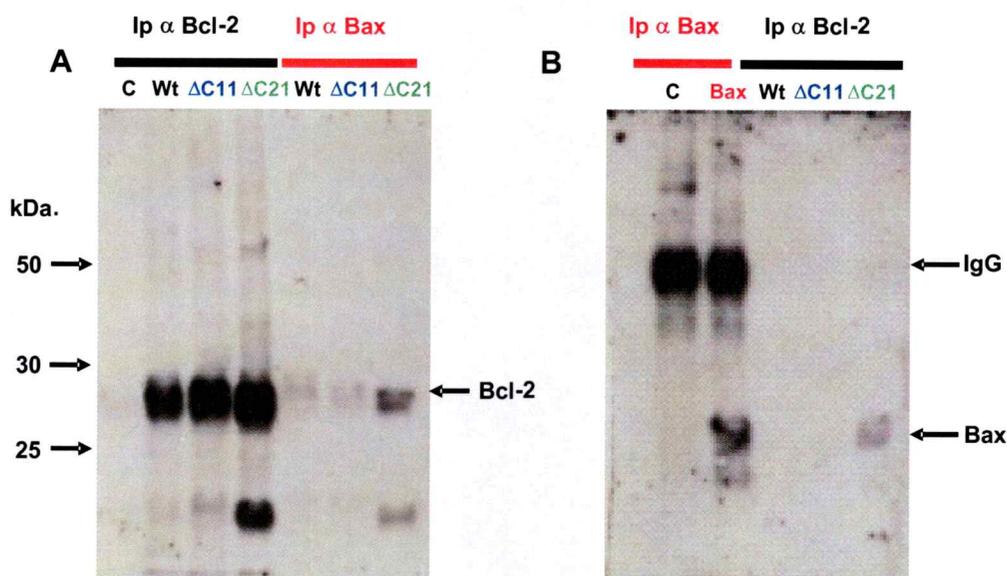


Figura 19. Bcl-2 y Bax interactúan en la membrana mitocondrial. Investigamos la posibilidad que Bax y Bcl-2 interaccionaran en la membrana mitocondrial, y si esta interacción es mediada por el extremo C-terminal. Para esto incubamos mitocondrias aisladas de hígado de rata con Bax, Bcl-2, Bcl-2ΔC11, Bcl-2ΔC21 y combinación de ellas. Posteriormente, las mitocondrias fueron centrifugadas y resuspendidas en tampón de resuspensión de mitocondrias (KCl 125 mM, EGTA 0,5 mM, succinato 5 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl 5 mM, pH: 7,2) conteniendo anticuerpos contra Bcl-2 y Bax conjugados con agarosa. Finalmente las mitocondrias fueron incubadas en hielo por 30 min y posteriormente centrifugadas. La presencia de Bax en las fracciones inmunoprecipitadas con anticuerpos anti Bcl-2, y de Bcl-2 en las fracciones inmunoprecipitadas con anticuerpos anti Bcl-2, se determino mediante *Western blot*.

La figura muestra un *Western blot* representativo de la co-inmunoprecipitación entre Bax y Bcl-2. En el panel A se detectó la presencia de Bcl-2, luego de haber incubado las mitocondrias con Bax y Bcl-2 y haber inmunoprecipitado contra Bax. Se observó la presencia de Bcl-2, Bcl-2ΔC11 y Bcl-2ΔC21. Este resultado parcial sugiere la interacción proteína-proteína entre Bax y Bcl-2. Por otro lado, en el panel B, se detectó la presencia de Bax, luego de haber incubado las mitocondrias con Bax y Bcl-2 y haber inmunoprecipitado contra Bcl-2. La presencia de Bax, sugiere que al menos esta proteína interactúa con Bcl-2ΔC21. En su conjunto estos resultados indican que Bax y Bcl-2 interactúan en la membrana mitocondrial, y en principio esta interacción no se encontraría mediada por el extremo C-terminal de Bcl-2.

(n=3)

Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21. Los resultados de los ensayos de co-inmunoprecipitación indicaron la presencia de Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 en la fracción de membrana de las mitocondrias inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-Bax (Figura 19 A, Ip α Bax). Así mismo se detectó la presencia de Bax en las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-Bcl-2 (Figura 19 B, Ip α Bcl-2).

Estos resultados en su conjunto demuestran que Bcl-2 y Bax interaccionan en la membrana mitocondrial, y al parecer la interacción entre estas proteínas en principio no se encontraría mediada por el extremo C-terminal de Bcl-2.

9. Papel del extremo C-terminal de Bcl-2 en el control del potencial de membrana mitocondrial.

El potencial de membrana de la mitocondria esta dado principalmente por el gradiente electroquímico de protones que existe entre el citosol y la matriz mitocondrial. Éste gradiente tiene su origen en el metabolismo mitocondrial, principalmente en el ciclo de Krebs, donde los diferentes equivalentes reductores, como NADH_2 y FADH , entregan sus electrones a los complejos proteicos de la cadena transportadora de electrones las que acoplan a este proceso de oxido reducción el transporte de protones hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. Dentro de los componentes moleculares de la maquinaria metabólica de la mitocondria, se encuentra la proteína cit c, la que cumple un papel fundamental en el transporte de electrones a través de la cadena de proteínas de la membrana mitocondrial. Debido a esta fundamental actividad, la fuga del cit c sugiere que la mitocondria tendría como consecuencia directa el colapso del potencial de membrana. Consecuentemente con este análisis se ha observado que el efecto de Bax y Bak recombinantes sobre mitocondrias aisladas es promover la liberación del cit c y como consecuencia el colapso del potencial de membrana. Por su parte, Bcl-2 inhibe ambos efectos sobre mitocondrias aisladas (34).

A la luz de estos resultados, se exploró la posibilidad que el extremo C-terminal de Bcl-2 se encuentre implicado en evitar el colapso del potencial de la membrana mitocondrial inducido por Bax. Para explorar esta posibilidad se estimó el cambio en el potencial de membrana de mitocondrias aisladas luego

de ser incubadas en ausencia o en presencia de las proteínas recombinantes con la sonda fluorescente Rodamina 123. La estimación del cambio en el potencial de membrana de la mitocondria se realizó mediante el calculo de la diferencia entre la razón de fluorescencia (520/495) basal, obtenida en ausencia o en presencia de proteínas recombinantes, y la obtenida luego de la adición del ionóforo de protones, CCCP. En ausencia de proteínas recombinantes, la adición de CCCP a las mitocondrias tuvo como consecuencia la disminución en la razón de fluorescencia, obteniéndose así el cambio máximo en la razón de fluorescencia (Figura 20A, control). Por el contrario, el cambio en la razón de fluorescencia luego de la adición de CCCP a mitocondrias pre-incubadas con Bax, es mínimo (Figura 20A, Bax). Consistente con la función anti-apoptica, la preincubación de las mitocondrias con Bcl-2 previo a la incubación con Bax, previene el colapso del potencial de membrana (Figura 20A, Bax + Bcl-2).

En resumen, Bax colapsa el potencial de membrana mitocondrial, ya que el cambio en la razón de fluorescencia relativa luego de la adición de CCCP es pequeño (Figura 20B, Bax). Sin embargo, la presencia previa de Bcl-2 evita que la adición posterior de Bax provoque el colapso del potencial de membrana, ya que se observo un mayor cambio en la razón de fluorescencia relativa luego de la adición de CCCP (Figura 20B, Bax + Bcl-2). Interesantemente, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 no evitan que Bax colapse el potencial de la membrana mitocondrial, ya que se no se observo con claridad que estas proteínas indujeran un mayor cambio en la razón de fluorescencia relativa luego de la adición de CCCP (Figura 20B, Bax + Bcl-2 Δ C11/ Bcl-2 Δ C21).

Estos resultados en su conjunto demuestran que Bcl-2 requiere de su extremo C-terminal para modular el potencial de membrana de la mitocondria.

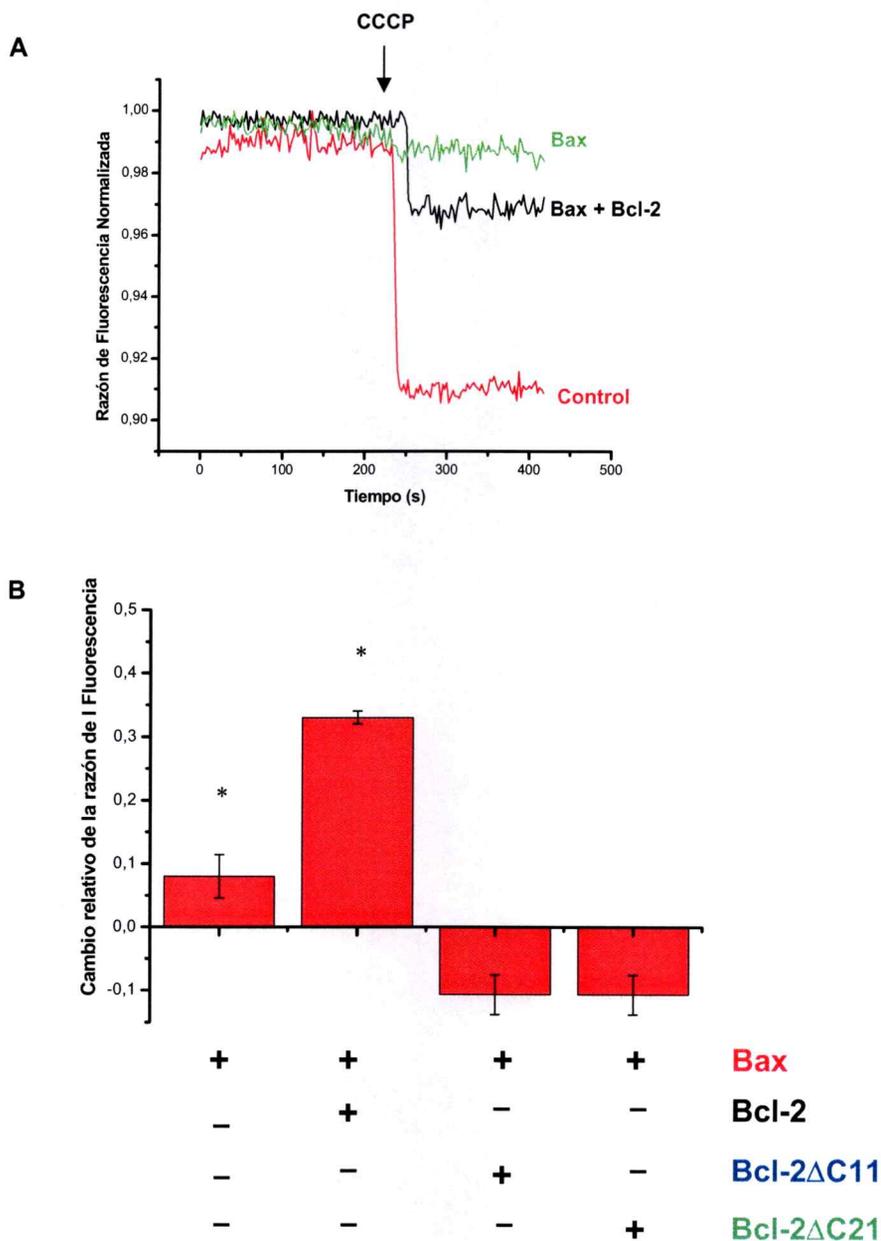


Figura 20. Papel funcional del extremo C-terminal de Bcl-2 en el control del potencial de membrana mitocondrial. Para estudiar el rol del extremo C-terminal en la modulación de la permeabilidad de la membrana estimamos el cambio en el potencial de membrana de la mitocondria cuando es expuesta a Bax, tanto en ausencia como en presencia de Bcl-2 o de las mutantes en el extremo C-terminal.

A. Para esto, las mitocondrias fueron pre-incubadas a 37 °C por 20 min en ausencia (control) o en presencia de las diferentes combinaciones de proteínas. Posteriormente fueron incubadas 3 min con la sonda fluorescente R123, determinando el cambio en la razón de intensidad de fluorescencia inicial y luego de agregar el inóforo CCCP. Se considera el cambio máximo en la razón de intensidad de fluorescencia al generado por CCCP.

B. Grafico que representa el cambio relativo de la razón de intensidad de fluorescencia en respuesta a Bax y a Bax combinada ya sea con Bcl-2 o Bcl-2ΔC11/Bcl-2ΔC21. La concentración de Bax durante el ensayo fue de 8,4 ng/μl, y de Bcl-2 y sus mutantes de 28 ng/μl.

(n=3, * p< 0,05)

DISCUSIÓN

El objetivo central de esta tesis fue definir los determinantes moleculares de la proteína Bcl-2 que se encuentran involucrados en la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Para lograr este objetivo se combinaron la expresión y purificación de proteínas recombinantes con ensayos bioquímicos de interacción de proteínas; registros electrofisiológicos en un sistema de bicapas lipídicas planas, estimación de cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y liberación de la proteína cit c desde mitocondrias aisladas.

Para estudiar los aspectos moleculares de las proteínas fue necesario contar con las proteínas purificadas. La ventaja de contar con un sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes, es poder trabajar con proteínas nativas y mutantes, así como también diseñar diferentes ensayos experimentales que nos ayuden a identificar determinantes moleculares y proponer diversos mecanismos de acción de estas proteínas.

En una etapa inicial, y punto clave para la realización de esta tesis, fue la purificación de las proteínas recombinantes Bax y Bcl-2 de largo total, así como también de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21. La razón para trabajar con las versiones de largo total de estas proteínas, es que la evidencia estructural y funcional publicada hasta ahora, se obtuvo con versiones truncadas de Bax y Bcl-2. La razón para eliminar el extremo C-terminal de estas proteínas, fue aumentar el rendimiento de la purificación (8, 23, 36, 42). Por lo tanto los modelos acción

propuesto a partir de estos experimentos, carecen de datos funcionales del extremo C-terminal de estas proteínas.

Para la elección del sistema de expresión de proteínas, se consideró las características bioquímicas y fisicoquímicas de las proteínas a purificarse, así como también la reproducibilidad, rendimiento y el grado de pureza esperado para la técnica. Dadas las propiedades bioquímicas de Bax y Bcl-2 de largo total, se esperó que estas proteínas fuesen difíciles de purificar, debido básicamente a su baja solubilidad. Para superar esta dificultad, fue necesario diseñar una estrategia bioquímica tal que fuese posible la purificación de proteínas hidrofóbicas. La clave de la técnica de purificación utilizada, fue la combinación entre el control del tiempo de expresión de proteínas y en el caso de Bcl-2 particularmente, el uso del detergente zwitteriónico CHAPS. Bcl-2 al expresarse se asocia con la membrana de la bacteria, por lo que la utilización de detergentes durante la purificación permite que las proteínas de membrana de baja solubilidad entren en solución, aumentando directamente el rendimiento de la purificación. No obstante, dependiendo de las características del detergente, las proteínas pueden sufrir cambios estructurales que exponen los aminoácidos apolares al medio acuoso, lo cual podría tener consecuencias funcionales en la proteína purificada. Particularmente, se seleccionó el uso de CHAPS por ser un detergente que en bajas concentraciones no altera la estructura funcional de las proteínas. En el caso de Bax, esta proteína se expresa de manera soluble, lo cual permite una extracción mucho más simple. Sin embargo, el uso de Tritón X-100 en baja concentración fue necesario en las

etapas de lavado, para evitar interacciones inespecíficas de otras proteínas con la resina de afinidad.

Inicialmente se observó que la inducción de la expresión de Bax trajo como consecuencia una rápida disminución en la tasa de crecimiento del cultivo. La aguda disminución en la densidad óptica del cultivo de bacterias, demuestra que la expresión de Bax induce la muerte de la célula huésped (Figura ANEXO V). Esta observación sugiere que esta proteína mantiene sus propiedades proapoptóticas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual, Bax promueve la muerte del cultivo de bacterias. Probablemente la lisis de las bacterias inducida por la expresión de Bax, tenga relación con su similitud estructural con porinas bacterianas, cuyo mecanismo de acción es integrarse en la membrana de la bacteria, donde oligomeriza y forma poros que alteran el equilibrio electroquímico, induciendo finalmente la lisis de la célula (44). Poco se conoce de la existencia de un mecanismo de muerte con las características moleculares de la apoptosis en bacterias, o si existen proteínas relacionadas con la familia Bcl-2 que controlen los mecanismos de muerte en estos organismos unicelulares. Sin embargo, la similitud estructural de Bax, Bcl-2 y Bcl-X_L con porinas bacterianas y su documentada capacidad de formar poros en membranas lipídicas artificiales, sugieren que Bax induce la muerte de los cultivos de bacterias al aumentar la permeabilidad de la membrana de estas células (19, 32, 33).

En el caso de Bcl-2, la inducción de la expresión no parece tener un efecto significativo en la viabilidad del cultivo celular, ya que solo se observa una

disminución en la tasa crecimiento y no la muerte del cultivo como en el caso de Bax (Figura ANEXO V).

Todas las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA) en un alto grado de pureza ($\geq 95\%$) determinado mediante geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Paralelamente, se identificó el producto de purificación con anticuerpos específicos mediante *Western blot*. Tanto Bcl-2 como Bax recombinantes inmuno-reaccionaron de manera específica con los anticuerpos anti-Bcl-2 y anti-Bax (Tabla I), no observándose bandas adicionales o reacción cruzada que pudiese sugerir la presencia de posibles proteínas contaminantes. La caracterización bioquímica realizada a las proteínas purificadas demostró que la metodología utilizada es de uso rutinario y reproducible, adecuada para estudiar las propiedades moleculares de Bax y Bcl-2.

Para poder identificar los determinantes moleculares de Bcl-2 implicados en la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, fue necesario diseñar una estrategia experimental que permitiera poner a prueba la hipótesis. La estrategia experimental general apuntó a modificar la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la proteína Bax. La acción de ésta sobre la mitocondria indujo la salida del cit c, el cual pudo ser determinado mediante *Western blot*. Por lo tanto el ensayo funcional inicial de Bax, fue la liberación del cit c. Una vez definida las condiciones experimentales en las que Bax promueve la salida del cit c, se establecieron las condiciones bajo las que Bcl-2 inhibió la

acción de Bax. Por lo tanto el ensayo funcional de Bcl-2 consistió en inhibir la salida del cit c inducida por Bax desde mitocondrias aisladas. Adicionalmente, el mismo modelo experimental permitió estudiar la interacción de Bax y Bcl-2 con la membrana mitocondrial. Luego de cada ensayo de liberación del cit c, se detecto mediante *Western Blot* la presencia de Bax y Bcl-2 recombinantes en la membrana mitocondrial.

Primero se estudio la capacidad de Bcl-2 de interaccionar con la MME. Los resultados muestran que bajo las condiciones experimentales utilizadas, Bcl-2 recombinante se asoció fuertemente a la membrana mitocondrial (Figura 5A). La presencia de Bcl-2 en la fracción de membrana de mitocondria, luego del tratamiento alcalino (Na_2CO_3 , pH: 11,5), sugiere que la interacción de esta proteína con la MME no es de origen electroestático (28). La presencia de Bcl-2 en la fracción de membrana resistente al tratamiento alcalino, sugiere esta proteína por un lado, se integra en la MME, o se asocia con proteínas integrales de la MME, probablemente a través de interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, Bax recombinante es suficiente para promover la liberación del cit c *in vitro* (Figura 6A), pero no de AIF (Figura 18, panel D). Estos datos están de acuerdo con evidencia ya publicada (2). Los resultados obtenidos sugieren que la proteína Bax recombinante es funcional y no requiere de agentes adicionales para ejercer su función. Evidencia bioquímica adicional, muestra que Bax en solución se encuentra formando oligómeros (Figura 7, carril 3B). Probablemente, la utilización de Tritón X-100 durante las etapas de lavado, causó un cambio conformacional en la proteína promoviendo la interacción

entre monómeros de Bax. Esto daría cuenta de la actividad intrínseca que presenta la proteína Bax purificada (Figura 6). Por otro lado, Bax en presencia del detergente no iónico, β octil-glucósido, forma poros en bicapas lipídicas planas de gran conductancia y alta probabilidad de apertura (ANEXO III). Estas características son compatibles con las características de un poro proteico de grandes dimensiones, el cual podría que permitir el transporte de macromoléculas como el cit c.

Estos datos en su conjunto demuestran que Bax purificada presenta actividad que es consistente con la función pro-apoptótica descrita para esta proteína. De igual modo, se estudio la interacción de Bcl-2 con la membrana mitocondrial. Se determinó que Bcl-2 purificada se asocia a la membrana de la mitocondria y suprime el efecto de Bax (Figura 9). Estos resultados sugieren que Bcl-2 purificada presenta actividad que es consistente con su función anti-apoptótica. En resumen, los resultados en su conjunto demuestran que Bax y Bcl-2 interaccionan de manera fuerte con la membrana mitocondrial. Bax es suficiente para promover la salida del cit c, no obstante, la presencia previa de Bcl-2 en la membrana de la mitocondria evita que Bax modifique la permeabilidad de esta membrana. Por lo tanto contamos con un sistema en el cual podemos estudiar las propiedades funcionales de las proteínas.

Con este modelo, se puso a prueba la hipótesis trabajo, la cual propone que el domino BH3 y el extremo C-terminal de Bcl-2 participan en el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Sé observó que AA inhibe la función de Bcl-2, permitiendo que Bax actúe sobre la mitocondria promoviendo

la salida del cit c. Probablemente AA, al unirse a Bcl-2 en su bolsillo hidrofóbico, impide la interacción de esta proteína con el dominio BH3 de Bax, lo cual sugiere que el bolsillo hidrofóbico cumple un papel importante para su función. Si bien es cierto, existe evidencia que demuestra la importancia de ciertos aminoácidos puntuales del dominio BH3 de Bax (40), sería interesante estudiar el efecto de las mutaciones puntuales en el dominio BH3 de Bcl-2, para poder definir los aminoácidos que participan en la modulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Los resultados de interacción de las mutantes Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 con la membrana mitocondrial, sugieren que Bcl-2 no requiere del extremo C-terminal para asociarse de manera fuerte con esta membrana. Esta evidencia está apoyada por toda la serie de trabajos en los que se describe la formación de poros o canales en bicapas lipídicas planas por parte de diferentes miembros de la familia Bcl-2. En estos estudios, las proteínas utilizadas carecían del extremo C-terminal. Sin embargo, para generar actividad electrofisiológica estas proteínas requieren de la inserción en la bicapa lipídica (19, 32, 33). Para poder explicar la unión de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 a la mitocondria, se analizó la secuencia primaria de Bcl-2 Δ C21, y se observó que los aminoácidos que forman el extremo C-terminal resultante son de carácter apolar, por lo cual la proteína podría insertarse mediante un mecanismo similar a la proteína de largo total (Figura 21A). Alternativamente, existe la posibilidad que en el mecanismo de inserción de Bcl-2 participen otros dominios anfipáticos de la proteína. Los posibles dominios serían los formados por las hélices α 5 y 6, las que tienen el

largo suficiente para atravesar la bicapa lipídica y mantener estable la inserción de Bcl-2 en la MME (Figura 21B).

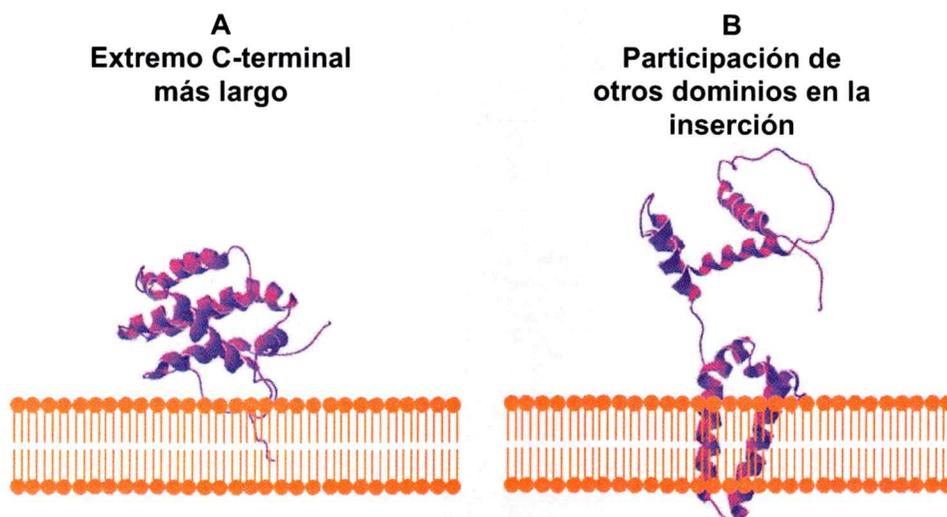


Figura 21. Modelo de inserción de mutantes de Bcl-2 en el extremo C-terminal.

En el esquema se presenta el modelo sugerido de inserción de Bcl-2 Δ 21 en la membrana lipídica. La asociación de Bcl-2 Δ C21 con la membrana de la mitocondria podría ocurrir según los modelos:

A. Parte de los residuos contenidos en el extremo C-terminal resultante de la mutación son de carácter apolar, por lo que permitiría que la proteína se asocie a la bicapa de la misma manera que el extremo C-terminal original (46).

B. En el mecanismo de inserción participan otros dominios anifáticos de la proteína, como lo son las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, las que atravesarían la bicapa lipídica, permitiendo la inserción de Bcl-2 (46).

Probablemente la asociación de Bcl-2 *in vivo* con la MME ocurre post-traduccionalmente, ya que no existe evidencia dentro de la secuencia de Bcl-2 de la existencia de un péptido señal que dirija la síntesis de la proteína a través RE. Probablemente, esto tendría que estar modulado por chaperonas moleculares que permitan aumentar la solubilidad de la proteína mientras se encuentra en el citosol.

La hipótesis de trabajo plantea la participación del extremo C-terminal de Bcl-2 en el mecanismo de regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Probablemente el extremo C-terminal de Bcl-2 inserto en la MME interaccionaría con Bax, regulando así su función pro-apoptótica. Los resultados obtenidos de la caracterización funcional de Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21 indican que se requiere del extremo C-terminal para lograr la inhibición de la salida del cit c y evitar el colapso del potencial de la membrana mitocondrial inducida por Bax *in vitro*. Esta es la primera evidencia que demuestra que el extremo C-terminal de Bcl-2 aunque no es necesario para la inserción de la proteína en la MME, si es un determinante molecular clave en la modulación de la proteína pro-apoptótica Bax en el ambiente de la membrana mitocondrial. Estos resultados modifican el modelo del mecanismo de acción de Bcl-2 que se tiene hasta el momento, en el cual el extremo C-terminal de Bcl-2 actuaría como señal de destinación a organelos intracelulares, y aporta información molecular de los determinantes de Bcl-2 implicados en la modulación de proteínas como Bax asociadas a la MME.

Resulta interesante poder estudiar la participación de las α hélices 5 y 6 de Bcl-2 en la posible interacción con Bax en el ambiente de la membrana de la mitocondrial. Se ha descrito que la presencia asparragina (N), glutamina (Q), así como de también de ácido aspártico (D) y glutámico (E) protonados en las α hélices trans-membranales, favorecen termodinámicamente la interacción de proteínas en el ambiente lipídico (37). Al observar la estructura primaria que forman de las α hélices 5 y 6 tanto de Bax como de Bcl-2 se observa que se encuentran formadas precisamente por estos aminoácidos. El estudio y la caracterización de las interacciones proteína-proteína en el ambiente lipídico de una membrana, es clave para poder comprender los diversos mecanismos acción de proteínas de membrana.

CONCLUSIÓN

El extremo C-terminal de Bcl-2 es un determinante molecular clave para el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Probablemente el mecanismo de regulación molecular de la permeabilidad en la membrana de la mitocondria, implica la interacción proteína-proteína entre los aminoácidos apolares del extremo C-terminal de Bcl-2 y los aminoácidos apolares de Bax que se encuentran dentro de la bicapa lipídica, probablemente los que forman parte de las hélices α 5 y 6.

REFERENCIAS

- 1.- Antonsson, B. y Col. Bax oligomerization is required for channel forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochemi. J.* 2000, 345:271-278.
- 2.- Arnoult, D. y Col.. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 2003, 22:4385-4399.
- 3.- Banerjee J, Ghosh S. Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 323:310-314.
- 4.- De Giorgi, F. y Col.. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J.* 2002, 10.1096/fj.01-0269fje.
- 5.- García-Sáez, A. y Col.. Membrane-insertion fragments of Bcl-xl, Bax, and Bid. *Biochemistry.* 2004, 43:10930-10943.
- 6.- Hinds, M. y Col.. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* 2003, 22: 1497-1507.
- 7.- Hsu, Y. y Col.. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl-XI during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:3668-3672.
- 8.- Jurmensmeier, J. y Col.. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 95:4997-5002.

- 9.- Kim, P. y Col.. Evidence for multiple mechanism for membrane binding and integration via Carboxyl-terminal insertion sequences. *Biochemistry*. 1997, 36: 8873-8882.
- 10.- Kim, K. y Col.. Biophysical characterization of recombinant human Bcl-2 and its interaction with an inhibitory ligand, antimycin A. *Biochemistry*. 2001, 40:4911-4922.
- 11.- Kluck, R. y Col.. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997, 275:1132-1136.
- 12.- Krajewski, S. y Col.. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer R*. 1993, 53:4701-4714.
- 13.- Lassus, P. Requirement for Caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002, 297:1352-1354.
- 14.- Li, L. y Col.: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001, 412:95-99.
- 15.- Martínez-Senac, M. y Col.. Study of the secondary structure of the C-Terminal Domain of the antiapoptotic protein Bcl-2 and its interaction with model membranes. *Biochemistry* 2000, 39:7744-7752.
- 16.- Martínez-Senac, M. y Col.. The structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Bak and its interaction with model membranes. *Biophys. J*. 2002, 81:233-243.
- 17.- Mikhailov, V. y Col.. Bcl-2 Prevents Bax Oligomerization in the Mitochondrial Outer membrane. *J Biol Chem* 2001, 276:18361-18374.

- 18.- Mikhailov, V. y Col.. Association of Bax and Bak Homo-oligomers in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 5367–5376.
- 19.- Minn, J. Velez, P. y Col.. Bcl-X_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997, 385:353-357.
- 20.- Nguyen, M. y Col.. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal Signal anchor sequence. *J Biol Chem.* 1993, 268: 25265-25268.
- 21.- Oltvai, Z. y Col.. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, 74:609-619.
- 22.- Petronilli, V. y Col.. The permeability transition, release of cytochrome c and cell death. *J Biol Chem* 2001, 276:12030-12034.
- 23.- Petros, A. y Col.. Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001, 98:3012-3017.
- 24.- Petros, A. y Col.. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1644:83-94.
- 25.- Priault, M. y Col.. Role of the C-terminal domain of Bax and Bcl-X_L in their localization and function in yeast cells. *FEBS Letters* 1999, 443:225-228.
- 26.- Reed, J. Apoptosis. *Methods in enzymology* 2000, 322:205-208.
- 27.- Reed, J. Apoptosis. *Methods in enzymology* 2000, 322:235-242.
- 28.- Roucou, X., Montessuit, S., Antonson, B., Martinou, J. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.* 2002, 368: 915-921.

- 29.- Sato, T. y Col.. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two hybrid system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1994, 91:9238-9242.
- 30.- Sedlak, T. y Col.. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1995, 92:7834-7838.
- 31.- Scaduto, R. y Col. Measurements of mitochondrial membrane potential using fluorescent Rhodamine derivatives. Biophys. J. 76: 469-477.
- 32.- Schendel, S. y Col. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94:5113-5118.
- 33.- Shendel, S. y Col.. Bcl-2 Family proteins as ion-Channels. Cell Death Differen. 1998, 5:372-380.
- 34.- Shimizu, S. y Col.. Proapoptotic BH3 only Bcl-2 family member induce cytochrome c release, But not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage dependent anion channel activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000,97:577-582
- 35.- Supersignal West pico Chemiluminescent Substrate product insert,.Pierce. Prod.34080
- 36.- Suzuki, M. y Col.. Structure of Bax: Coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell, 103:645-654.
- 37.- Tatko, C. y Col.. Polar networks control oligomeric assembly in membranes. Amn Chem. So. 2006, 28:4170-4171.
- 38.- Tunon, P. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in polyacrylamide gels. J Biochem Biophys Methods. 1984, 2:171-179

- 39.- Tzung, S. y Col.. Antimycin A mimics a cell-death inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nature Cell Biol.* 2001, 3:183-191.
- 40.- Wang, K. y Col.. Mutagenesis of the BH3 domain of Bax identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biology* 1998, 18:6083-6089.
- 41.- Wang, J. y Col.. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000, 97:7124-7129.
- 42.- Yang, J. y Col.. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997, 275:1129-1132.
- 43.- Yu, X. y Col.. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure* 2005, 13:1725-1735.
- 44.- Zalman, L. y Col.. Mechanism of insertion of diphtheria toxin: peptide entry and pore size determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984. Vol. 81(11): 3341-3345.
- 45.- Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., Reed, J. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2*. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:7440-7444.
- 46.- El diseño de estructuras fue realizado con la herramienta bioinformática Swiss-PDB Viewer. (<http://www.expasy.org/spdbv/>), basado en la secuencia de Bcl-2 humana (swiss-prot entry: P10415).

ANEXOS

ANEXO I.

Determinación del rango dinámico de la tinción de plata para geles de poliacrilamida.

La proteína Bax purificada fue utilizada como patrón para determinar el rango dinámico de detección de proteínas utilizando tinción de plata. Para esto se cargaron diferentes cantidades conocidas de la proteína Bax purificada en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones denaturantes (SDS). Los resultados indican que la menor cantidad de proteína, en este caso Bax, detectable por la tinción de plata se encuentra alrededor de 40 ng por banda (Figura Anexo I A). Este valor es al menos 10 veces mayor al reportado por otros autores (17), sin embargo la técnica utilizada nos asegura que las proteínas purificadas no contienen contaminantes que superen los 40 ng. El rango lineal de la tinción de plata utilizada es bastante limitado, ya que por sobre 120 ng no permite discriminar entre dos cantidades de proteínas 3 veces superior (Figura Anexo I B, n=2).

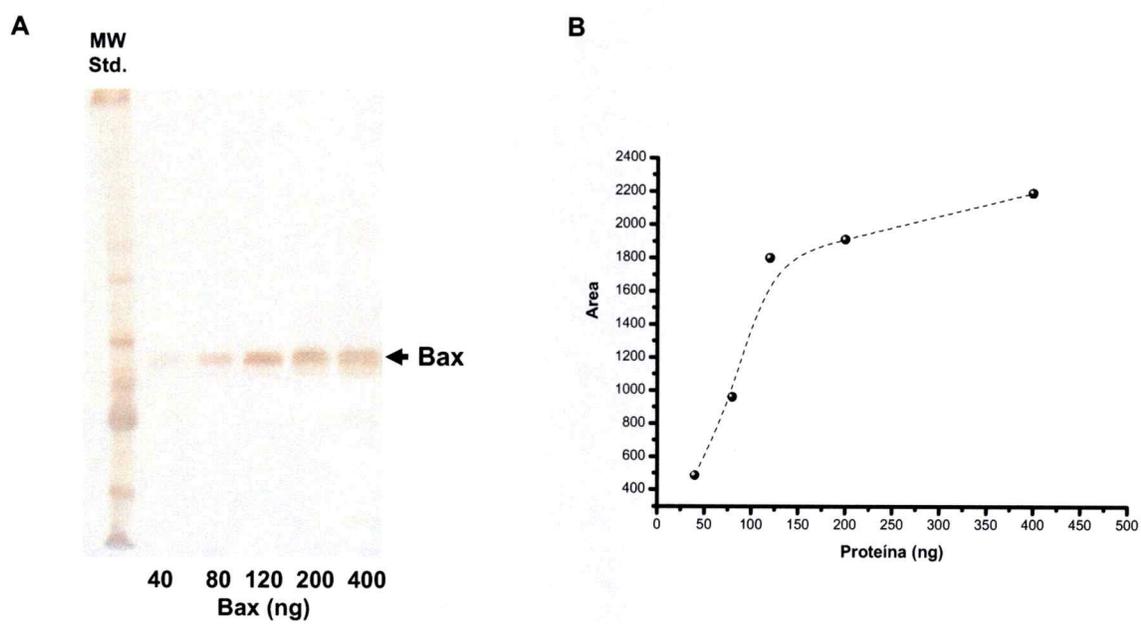


Figura anexo I

ANEXO II.

Determinación del efecto de β octil-glucósido sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Para estudiar el efecto del detergente β octil-glucósido en el mecanismo de liberación de cit c inducido por Bax, fue necesario determinar la concentración máxima del detergente a la cual la membrana de la mitocondria se mantiene impermeable a cit c. Para esto, mitocondrias aisladas de hepatocito de rata fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de β octil-glucósido durante 20 minutos a 37 °C, determinando posteriormente mediante *Western blot* la presencia de cit c en el medio de incubación de las mitocondrias (figura Anexo II).

Los resultados indican que solo a concentraciones superiores a 0.1 % del detergente es posible aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial a proteínas como el cit C. El grado de permeabilización de las mitocondrias con 0.5 % de β octil-glucósido es comparable con el control de permeabilización utilizado, que en este caso es 1 % de Tritón-X100. Los ensayos realizados con mitocondrias en presencia de Bax preincubada con β octil-glucósido contienen una concentración de detergente que no superior a 0.1 %.

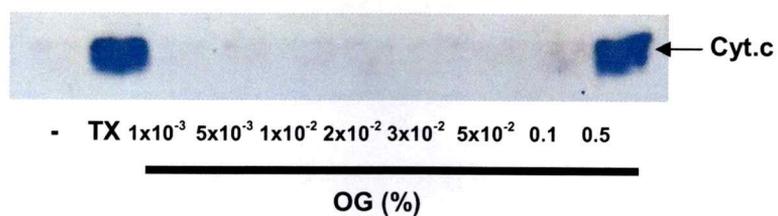


Figura Anexo II. Efecto de β octil-glucósido sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

En la figura se muestra un *Western blot* en el cual se identificó la presencia de citocromo c en el medio de incubación de mitocondrias tratadas con diferentes concentraciones de β octil-glucósido. (n=2)

ANEXO III.

Efecto de β octil-glucósido en la actividad electrofisiológica de Bax.

Idealmente el poro que permitiría el tránsito de una macro-molécula globular de 15 kDa. como el cit c bajo las condiciones de registro utilizadas tendría que tener una alta probabilidad de apertura y una conductancia aproximada de 1-2 nS. Nuestros datos nos permiten inferir que el poro formado por Bax bajo estas condiciones no sería el responsable de la salida de cit c desde la mitocondria. No obstante, la información bioquímica y funcional de Bax en presencia de β octil-glucósido sugiere que Bax se debe activar, es decir, oligomerizar en el MME como paso previo a la liberación de cit c.

Para estudiar si el detergente β octil-glucósido modifica las características electrofisiológicas registradas de Bax, se pre-incubó la proteína con el detergente (1,5 %) durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente la proteína tratada fue adicionada al compartimiento cis aplicando agitación durante 1 minuto. Bajo estas condiciones, la actividad electrofisiológica producida por Bax se caracteriza por ser un canal que permanece gran parte del tiempo abierto (P_o : 0,87) y ser de alta conductancia, cercana a 1 nS (Figura Anexo III).

De esta pequeña caracterización electrofisiológica de Bax podemos sugerir que esta proteína posee la capacidad de formar un poro de una alta conductancia a través del cual atravesaría a membrana externa de la mitocondria hacia el citosol macro-moléculas de bajo peso molecular como el cit c.

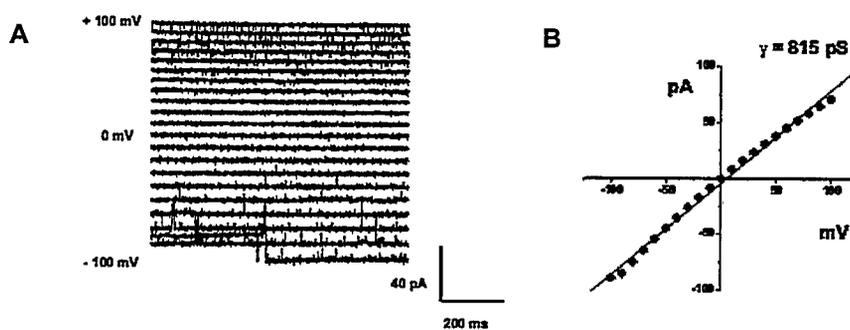


Figura Anexo III . Bax forma poros de alta conductancia en bicapas lipídicas planas.

A. Actividad electrofisiológica característica de la proteína Bax pre-incubada con β octil-glucósido (0,05 % máximo en el ensayo) registrada entre +100 y -100 mV.

B. Relación corriente versus voltaje para una familia de trazos representados en C. La conductancia determinada para el canal formado por Bax en presencia del detergente es de 815 pS en promedio.

ANEXO IV.

Vector de expresión pProEX-1.

El vector de expresión seleccionado fue el pProEX-1, el cual tiene la ventaja de ser inducible con IPTG y seleccionado con carbenicilina (Ampicilina). La secuencia nucleotídica de la proteína Bcl-2 humana o de Bax murina fue inserta en el sitio de corte de la enzima de restricción EcoR1. Otra característica de este vector es que permite la incorporación en el extremo amino-terminal de las proteínas la secuencia que codifica para seis histidinas contiguas, lo cual permite la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

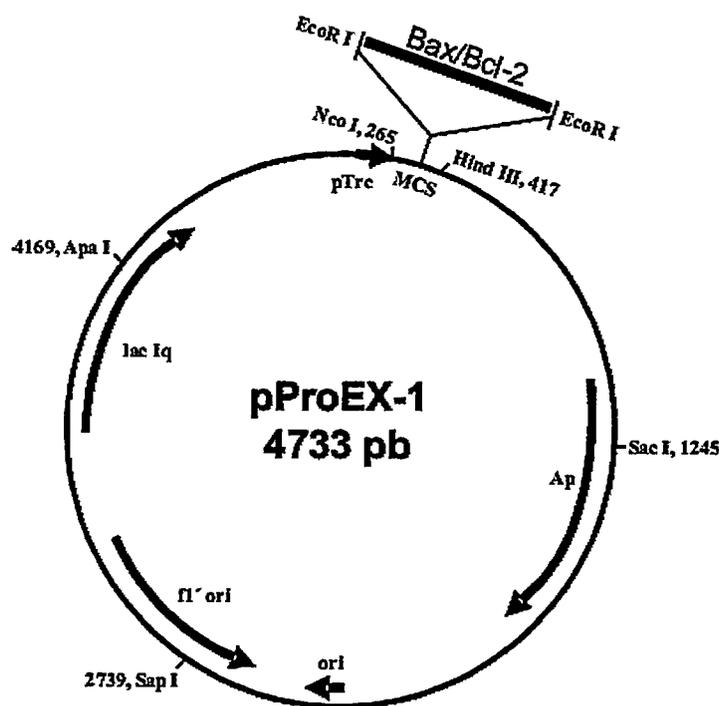


Figura ANEXO IV. Vector de expresión pProEX-1.

En el esquema se presenta el vector pProEX-1 utilizado para la expresión de las proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 y Bcl-2 Δ C21. El sitio de clonación múltiple (MCS: *Multi cloning site*) posee el sitio de corte para la enzima de restricción EcoRI, sitio en el cual se insertó la secuencia de las proteínas. La expresión de proteínas se encuentra bajo el control del promotor del operador *lac* y es seleccionado con carbenicilina (Ampicilina).

ANEXO V.

Curvas de crecimiento de *E.coli* M15 transformadas con Bax y Bcl-2.

La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes debe iniciarse en la etapa de crecimiento exponencial de las bacterias, ya que durante esa etapa la fuente de carbono es abundante y el número de células es el adecuado para obtener un buen rendimiento. Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizó la cepa comercial *E.Coli* M15 (Quiagen), las que fueron transformadas con el vector de expresión pProEX-1 que contiene la secuencia de Bax, Bcl-2, Bcl-2 Δ C11 o Bcl-2 Δ 21. Las células de interés fueron seleccionadas con carbenicilina y kanamicina, para asegurar la mantención de los vectores pProEx-1 y pREP-4, respectivamente.

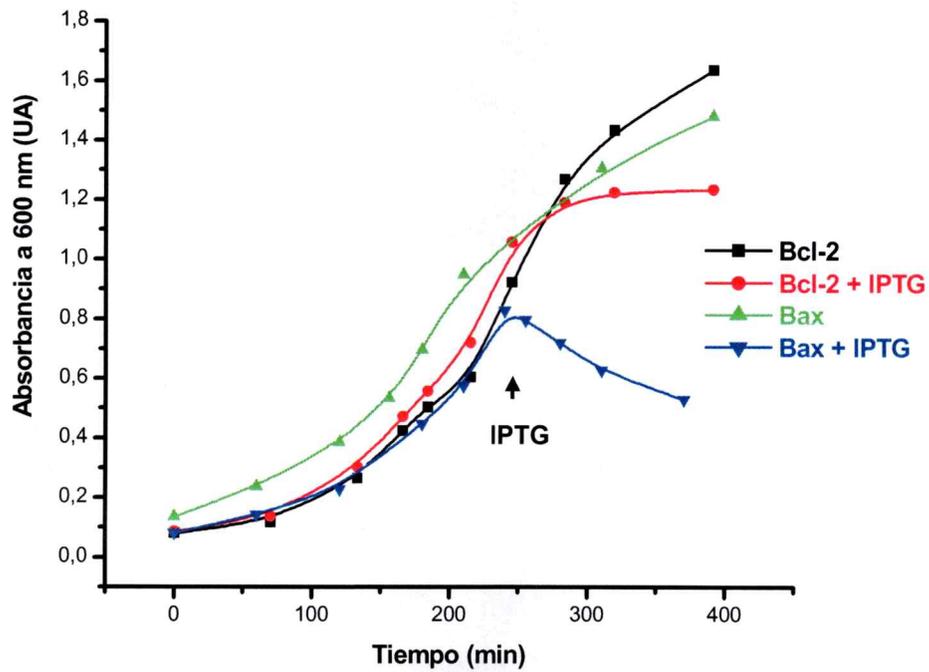


Figura ANEXO V. Curvas de crecimiento de *E. coli* M15 transformadas con pProEX-1/Bcl-2 o pProEX-1/Bax.

En el gráfico se muestran curvas representativas de crecimiento de las bacterias *E. coli* M15 transformadas con el vector pProEX-1/Bax y pProEX-1/Bcl-2. Para esto, se monitoreó la absorbancia (λ : 600nm) de los cultivos de bacterias transformadas aproximadamente cada 1 h. Luego se graficó la absorbancia observada versus el tiempo de cultivo.