

UCH-FC  
Biotecnología  
L25  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



## **“Caracterización de una nueva vía de apoptosis intrínseca independiente de BAX, BAK y ciclofilina D”**

Seminario de Título Entregado a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular



Sebastian Antonio Zamorano Villablanca

Septiembre, 2009  
Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Claudio Hetz PhD.



**“Caracterización de una nueva vía de apoptosis intrínseca independiente de BAX, BAK y ciclofilina D”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

***SEBASTIAN ANTONIO ZAMORANO VILLABLANCA***

*Dr. Claudio Hetz*  
**Director Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'CH' o similar, sobre una línea horizontal.

*Dr. Christian González-Billaut*  
**Patrocinante**

Una línea horizontal para la firma del patrocinante.



**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dr. Alvaro Glavic*  
**Presidente Comisión**

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Glavic', sobre una línea horizontal.

*Dra. Veronica Palma*  
**Correctora**

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Palma', sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Septiembre de 2009.

*“... conversé con filósofos que sintieron que dilatar la vida de los hombres era dilatar su agonía y multiplicar el número de sus muertes.”*

El inmortal, J. L. Borges.



## **Agradecimientos.**

Todos los que han compartido conmigo estos años de U saben que los llevo en el corazón y estoy agradecidísimo por su apoyo, alegría y cariño. Sin embargo, aquí va un pequeño resumen.

A mis padres Mario y Delia por la confianza y ayuda incondicional, especialmente frente a mi indecisión vocacional.

A mis hermanos, Mario y Pame que fueron un gran apoyo lejos de casa.

A mi familia, a todo el clan de Iquique y a mi familia en Arica por todo el cariño entregado desinteresadamente a través de los años.

A todos los amigos que conocí durante estos años de Universidad y espero que perduren por mucho tiempo más.

A mis hermanos charistas Richard, Quarry, Charlie, Daniel, Vicho y Dani y al charismo repartido a través del mundo, Mítico y Toño por estar a mi lado en los buenos y malos momentos.

A la Pomelo por todo el cariño que me ha entregado y por ser la alegría de mis días.

Y por último, a Claudio por la confianza, paciencia y enseñanzas y a todo el gran grupo humano del laboratorio de estrés celular y biomedicina, especialmente a la Fer y Diego, por todas las conversaciones, discusiones y conocimiento que me entregaron durante estos dos años en el lab.





## Índice de contenidos.

<b>Índice de figuras y tablas.</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de abreviaturas.</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen.</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>3</b>
1.1 Apoptosis.	3
1.2 Rol de la mitocondria en la via intrínseca de apoptosis.	5
1.3 Regulación de la vía intrínseca de apoptosis por la familia BCL-2.	6
1.4 Poro de transición permeable de la membrana mitocondrial.	11
1.5 Rol de la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas en la Apoptosis.	14
1.6 Interacción Mitocondria/RE y su rol en la Apoptosis.	15
1.7 ¿Vías apoptóticas intrínsecas independientes de BAX/BAK y PTP?	18
<b>2. Hipótesis.</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo General.	23
2.2 Objetivos Específicos.	23
<b>3. Materiales y Métodos.</b>	<b>24</b>
3.1 Reactivos.	24
3.2 Líneas celulares.	25
3.3 Cultivo Celular.	25
3.4 Generación de líneas celulares estables de shRNAs mediante infección lentiviral.	25
3.5 Expresión transiente de proteínas BH3-only en MEFs.	27
3.6 Ensayo de muerte en células con bajo suero y en condiciones de estrés.	27
3.7 Liberación de Citocromo c.	28
3.8 Potencial Mitocondrial.	29
3.9 Extracción de RNA, RT-PCR y PCR en tiempo real.	29
3.10 Análisis de Western Blot.	30
<b>4. Resultados.</b>	<b>31</b>
4.1 Las células BAX/BAK DKO experimentan reducción del potencial mitocondrial y liberación de citocromo c bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero.	31

4.2 La susceptibilidad de las células BAX/BAK DKO a la muerte mediada por estrés celular y privación de suero es específica para estímulos que perturban la homeostasis del RE.	34
4.3 La muerte de las células BAX/BAK DKO bajo condiciones de privación de suero y estrés de RE es independiente de las proteínas BH3-only.	37
4.4 La muerte celular en las células BAX/BAK DKO bajo condiciones de privación de suero y estrés de RE es independiente de ciclofilina D.	44
<b>5. Discusión.</b>	<b>48</b>
5.1 Activación de apoptosis intrínseca en la ausencia de BAX y BAK.	49
5.2 Mecanismo de liberación de citocromo c independiente de BAX/BAK y ciclofilina D.	49
5.3 Regulación de la vía apoptótica.	51
5.4 Especificidad del estímulo de muerte celular.	53
5.5 Regulación río arriba del estímulo apoptótico.	55
<b>6. Conclusiones.</b>	<b>56</b>
<b>7. Referencias.</b>	<b>59</b>





## Índice de figuras y tablas.

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>página</b>
Figura 1	Regulación de la apoptosis intrínseca.	10
Figura 2	Mecanismos de traslocación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma durante la apoptosis.	13
Figura 3	Apoptosis dependiente de estrés de RE.	17
Figura 4	La privación de suero recupera la susceptibilidad de las células BAX/BAK DKO a la muerte celular inducida por estrés de RE.	21
Figura 5	Inducción de marcadores clásicos de apoptosis en células BAX/BAK DKO en condiciones de estrés de RE y privación de suero.	22
Figura 6	Caracterización de la muerte celular a través de la medición de marcadores clásicos de apoptosis.	33
Figura 7	La apoptosis de las células BAX/BAK DKO ocurre específicamente bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero y no bajo otros estímulos intrínsecos de muerte celular	36
Figura 8	Los niveles de ARNm de las proteínas BH3-only BIM, PUMA y NOXA son inducidos en condiciones de estrés de RE.	39
Figura 9	Las células BIM/PUMA DKO son resistentes a la muerte celular inducida por estrés de RE, pero desarrollan apoptosis en condiciones de privación de suero.	40
Figura 10	La sobre-expresión de proteínas pro-apoptóticas BH3-only no induce apoptosis en condiciones de privación de suero en las células BAX/BAK DKO.	43
Figura 11	La sobre-expresión de SERCA o la inhibición de ciclofilina D no influyen en la muerte celular producida por privación de suero y estrés de RE en células BAX/BAK DKO.	45
Figura 12	La apoptosis observada en células deficientes de BAX y BAK frente a estrés de RE y privación de suero es independiente de la expresión de ciclofilina D.	47
Figura 13	Modelo especulativo para explicar la apoptosis mediada por estrés de RE bajo condiciones de privación de suero independiente de BAX/BAK y de PTP.	57
Tabla 1	Partidores para PCR cuantitativo.	30



## Lista de abreviaturas.

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ADP	adenosin difosfato
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	adenine nucleotide translocase
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ArA	arakidonic acid
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
BAD	BCL-2-associated death promoter
BAK	BCL-2 homologous antagonist killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	Basal cell lymphoma-extra large
BH	BCL-2 homology
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer
BMF	BCL-2 modifying factor
BOK	BCL-2-like ovarian killer

DIABLO	direct inhibitor of apoptosis-binding protein of low pi
DIOC	dihexyloxacarboyanine iodide
DKO	double knock out
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
GSK3- $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
HEK	human embryonic kidney
IP	ioduro de propidio
IP3	Inositol triphosphate
IRE1 $\alpha$	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 alfa
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KO	knock out
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MEF	mouse embryonic fibroblast
P53	protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PERK	protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
PTP	permeability transition pore
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis
RE	retículo endoplasmático
RT-PCR	real time PCR



SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SFB	suero fetal bovino
shARN	short hairpin ARN
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SV40	Simian virus 40
t-BID	Truncated-BID
TNF	Tumor necrosis factors
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UPR	unfolded protein response
VDAC-2	Voltage-dependent anion channel 2
WT	wild type



## **Resumen.**

La mayoría de los estímulos intrínsecos de muerte celular convergen en la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2 en la membrana externa de la mitocondria. Esto produce la liberación de citocromo c hacia el citoplasma y la consiguiente activación de caspasas. Las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK constituyen el núcleo en el cual convergen los diferentes estímulos apoptóticos intrínsecos. El estrés crónico del retículo endoplasmático (RE) produce una regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas BH3-only que llevan a un activación de BAX y BAK en la mitocondria. En este trabajo se presentan evidencias que sugieren la existencia de apoptosis gatillada específicamente por estímulos que producen estrés de RE en condiciones de privación de suero en células doble deficientes en BAX y BAK. Esta apoptosis pudo ser revertida parcialmente con inhibidores de caspasas, sin embargo, resultó insensible a la expresión de proteínas pro-apoptóticas BH3-only. Cabe destacar que la muerte celular independiente de BAX/BAK no se vió afectada por tratamientos con ciclosporina A o mediante el silenciamiento del gen de ciclofilina D, un componente esencial del poro de transición permeable de la mitocondria. Nuestros resultados sugieren la existencia de una vía alternativa de apoptosis mitocondrial que es gatillada por estrés de RE en condiciones de privación de suero, la cual es independiente de ciclofilina D y de proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2.

## **Abstract.**

Most intrinsic death signals converge into the activation of pro-apoptotic BCL-2 family members at the mitochondria, resulting in the release of cytochrome c and caspases activation. Pro-apoptotic BCL-2 family member BAX and BAK constitute an essential gateway to the mitochondrial-mediated apoptosis pathway. Chronic endoplasmic reticulum (ER) stress leads to apoptosis through the upregulation of a subset of pro-apoptotic BH3-only proteins, which activate BAX and BAK at the mitochondria. Here we present evidence indicating the engagement of ER stress-dependent apoptosis in BAX and BAK double knockout (DKO) cells when stress stimulation is performed under mild serum withdrawal, a phenomenon that was not observed with other intrinsic death stimuli. Apoptosis under these conditions was blocked by general caspase inhibitors but was insensitive to BH3-only proteins expression. Interestingly, BAX/BAK-independent apoptosis was unaffected by cyclosporin A treatments or cyclophilin D knockdown, an essential component of the mitochondrial membrane permeability transition pore. Our results suggest the existence of an alternative intrinsic apoptosis pathway emerging from the mitochondria induced by ER stress and serum withdrawal that is independent of cyclophilin D and BCL-2 family pro-apoptotic proteins expression.

## **1. Introducción.**

### **1.1 Apoptosis.**

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada conservada a través de todos los metazoos. La apoptosis es esencial para la homeostasis celular en los tejidos en desarrollo y a lo largo de la adultez de los organismos multicelulares (Danial and Korsmeyer, 2004). Por ejemplo, la muerte celular por apoptosis es crucial durante el desarrollo en la morfogénesis de los tejidos y la mantención de la función del sistema inmune, entre otros (Opferman and Korsmeyer, 2003). Sin embargo, mediante ensayos de ganancia y pérdida de función de genes involucrados en la regulación de la apoptosis en ratones y estudios genéticos en pacientes, se ha visto que la desregulación de este proceso puede desencadenar diferentes patologías. Por ejemplo, una disminución de la apoptosis puede contribuir a la formación de tumores debido a la inmortalización celular y la replicación descontrolada de la célula llevando al cáncer o enfermedades autoinmunes. Por el contrario, el aceleramiento de este proceso podría conducir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, la inmunodeficiencia y también a la infertilidad (Youle and Strasser, 2008).

La apoptosis fue inicialmente definida durante el desarrollo, basado en la observación de manifestaciones morfológicas en la célula como arredondamiento de la célula, retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular y nuclear, fragmentación nuclear y pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Kerr et al., 1972). Además, existen marcadores bioquímicos de la apoptosis como son la activación

masiva de ciertas proteasas llamadas caspasas, la pérdida del potencial mitocondrial, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la exposición de fosfatidilserinas hacia el exterior celular (Kroemer et al., 2009).

Existen dos vías generales de transducción de señales que llevan a la inducción de la apoptosis: las vías intrínseca y extrínseca (Green, 2000). Ambas rutas desencadenan en la activación de un grupo de cisteína-proteasas, denominadas caspasas, que a través del corte proteolítico de proteínas en sus residuos aspartato desmantelan irreversiblemente diferentes estructuras celulares necesarias para la sobrevivencia celular. Por ejemplo, las caspasas son las encargadas de desmantelar la lámina nuclear en donde se organiza la cromatina, además de inactivar diferentes proteínas estructurales involucradas en el citoesqueleto. Por otro lado, la activación de las caspasas lleva a la activación de la DNasa CAD (DNasa activada por caspasas), lo que promueve a la degradación del ADN en un patrón internucleosómico (Thornberry and Lazebnik, 1998).

En la vía extrínseca, la muerte celular es gatillada por estímulos externos, a través de la unión de un ligando como el factor de necrosis tumoral (o TNF de sus siglas en inglés, Tumor Necrosis Factor) o ligando Fas con su receptor (TNFR o Fas, respectivamente). Estos receptores poseen un dominio de muerte intracelular que recluta a diferentes adaptadores, llevando a la unión y activación conformacional de caspasas iniciadoras como la caspasa-8. Esto inicia una cascada amplificadora de la señal mediada por la activación por proteólisis de caspasas efectoras, como caspasa-3, -6 o -7, las que ejecutan la muerte celular. En el caso de la vía intrínseca, la apoptosis puede ocurrir por estímulos intracelulares como infección viral, daño del ADN, privación de

factores de crecimiento, estrés de retículo endoplasmático (RE) o activación de programas genéticos. Como se verá mas adelante, estos estímulos llevan finalmente a la activación de la caspasa iniciadora, caspasa-9, con la posterior activación proteolítica de caspasas ejecutoras (Green, 2000).

### **1.2 Rol de la mitocondria en la via intrínseca de apoptosis.**

La vía de apoptosis intrínseca también es conocida como la vía mitocondrial, ya que los estímulos que causan este tipo de apoptosis llevan a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, lo que a su vez produce la liberación de proteínas como SMAC/DIABLO (del inglés Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-binding protein with low pI), AIF (del inglés Apoptotic Inducing Factor) y citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citoplasma. En el citoplasma, el citocromo c une a una proteína adaptadora llamada APAF1 (de las siglas en inglés Apoptotic Protease Activating Factor 1) formando un anillo heptamérico que recluta a pro-caspasas-9. Este complejo es conocido como apoptosoma y es esencial para la activación de la apoptosis (Bao and Shi, 2007). La unión de la pro-caspasa-9 al anillo heptamérico provoca un cambio conformacional en la pro-caspasa-9, permitiendo su dimerización, generando caspasa-9 activa (Figura 1B). Esta caspasa iniciadora, luego activa directamente a las caspasas efectoras caspasa-3 y caspasa-7 mediante corte proteolítico (Wang, 2001).

La importancia de los componentes del apoptosoma en la vía intrínseca se ejemplifica en los fenotipos descritos de células deficientes para *citocromo c* (Li et al.,

2000), *apaf-1* (Yoshida et al., 1998), *caspasa-9* (Kuida et al., 1998) o *caspasa-3* (Kuida et al., 1996). Estas células son resistentes a desarrollar apoptosis mediada por una variedad de estímulos de muerte celular intrínsecos.

### 1.3 Regulación de la vía intrínseca de apoptosis por la familia BCL-2.

Todo proceso esencial para la sobrevivencia de una célula es altamente regulado y los procesos relacionados con la vía intrínseca de apoptosis no son la excepción. Así, la decisión de una célula de “cometer suicidio” es altamente controlado por proteínas de la familia BCL-2 (por las siglas en inglés **B**-cell lymphoma-2, ya que fue descubierta como una traslocación cromosomal en lymphomas de células B). Las proteínas de la familia BCL-2 ejercen su regulación de la muerte celular río arriba de la mitocondria, regulando la translocación de citocromo c hacia el citoplasma. En términos generales, la familia BCL-2 esta formada por miembros tanto anti- como pro-apoptóticos. Esta familia está definida por su miembro fundador BCL-2 (Tsujimoto et al., 1985; Vaux et al., 1988), donde sus componentes pueden compartir hasta cuatro dominios  $\alpha$ -hélices de homología con BCL-2, llamados dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 (por las siglas en inglés **BCL-2** homology domains, Figura 1A).

Dentro de la primera clase, los que inhiben la apoptosis (anti-apoptóticas), se encuentra BCL-2 además de BCL-X<sub>L</sub>, MCL-1, A1, entre otros. Este subgrupo posee homología en los 4 dominios, desde el dominio BH1 hasta BH4 (Figura 1A). La segunda clase, la de las proteínas que inducen apoptosis, posee dos subgrupos. Primero están los miembros pro-apoptóticos de multidominio BAX, BAK y BOK. Estos poseen

homología en los dominios BH1 hasta BH3. El segundo subgrupo pro-apoptótico es llamado proteínas "BH3-only", ya que poseen homología solo en el dominio BH3 (por ejemplo BIM, PUMA, BAD y BID, Figura 1A).

Evidencias genéticas han demostrado que las proteínas BAX y BAK son esenciales para la activación de la apoptosis ya que células doble-deficientes en estas proteínas son altamente resistentes a estímulos de muerte intrínsecos (Wei et al., 2001). La activación de BAX y BAK está directamente regulada por las proteínas BH3-only, las que actúan como moduladores río arriba de esta vía (Figura 1B). En un estado basal, sin señales de muerte, los niveles de proteínas BH3-only son bajas y las existentes se encuentran asociadas a proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2, las que inhiben su función pro-apoptótica (Cheng et al., 2001; Letai et al., 2002). BAX se encuentra como monómero en el citoplasma y BAK se localiza en la membrana de la mitocondria donde está inhibido mediante su asociación con VDAC-2, un canal dependiente de diferencia de potencial aniónico (Cheng et al., 2003).

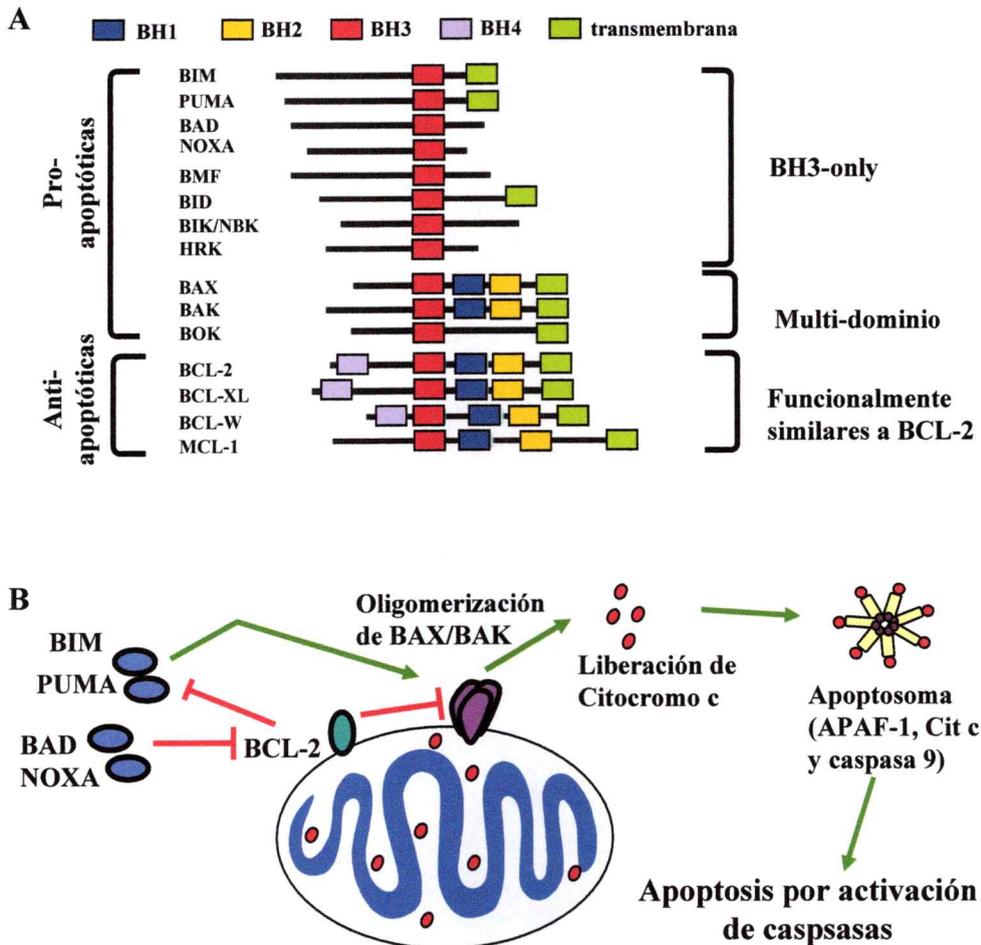
Diferentes señales de daño celular llevan a una regulación positiva de las proteínas BH3-only. Esta activación puede ser transcripcional, como es el caso de NOXA y PUMA, las que son inducidas por el factor transcripcional p53 en respuesta a daño irreversible al ADN (Michalak et al., 2008). Otro ejemplo es la proteína BH3-only BIM, la cual es inducida transcripcionalmente en células bajo estrés del retículo endoplásmico (RE) (Puthalakath et al., 2007). La activación de proteínas BH3-only también puede ser regulada a nivel post-traducciona (Kutuk and Letai, 2008). Por ejemplo, la proteína BAD es activada por desfosforilación en respuesta a falta de factores de crecimiento. Por otro lado, la proteína BH3-only BID es activada por

proteólisis mediada por caspasa-8, generando la forma truncada pro-apoptótica tBID. Por último, BIM también es activada por fosforilación y disociación del complejo motor de dineína (Puthalakath et al., 1999).

Las proteínas BH3-only a su vez pueden ser subdivididas en dos grupos de acuerdo a su función. Están las BH3-only sensibilizadoras que modulan la apoptosis regulando a BAX/BAK indirectamente (BAD, NOXA, BMF y BIK) y las activadoras que inducen directamente apoptosis mediada por BAX y BAK (como BIM, PUMA y t-BID) (Kim et al., 2006; Letai et al., 2002) (Figura 1B). La diferencia entre las proteínas BH3-only activadoras y sensibilizadoras reside en que las primeras pueden activar a BAX/BAK de manera directa, mientras que las sensibilizadoras lo hacen de manera indirecta, a través de la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas (Figura 1B) (Youle and Strasser, 2008). Las proteínas BH3-only, al ser reguladas positivamente, rompen el equilibrio entre proteínas anti- y pro-apoptóticas. Luego las BH3-only activadoras libres interactúan con BAX/BAK, generando un cambio de conformación en estas que llevará a su homo-oligomerización en la membrana externa de la mitocondria. Este proceso es esencial en la posterior liberación de citocromo c con la consecuente activación de la apoptosis. Por otro lado, las proteínas BH3-only sensibilizadoras, que tienen más afinidad por las proteínas anti-apoptóticas se unen a estas y desplazan a las BH3-only activadoras ya unidas a las proteínas anti-apoptóticas, activando así a BAX y BAK (Figura 1B) (Kim et al., 2006; Letai et al., 2002).

Basado en estos antecedentes es posible establecer una jerarquía entre los miembros de la familia BCL-2 donde las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK constituyen el núcleo central donde convergen los estímulos de muerte asociados a la

activación de proteínas BH3-only particulares (Figura 1B). Es así como los ratones doble deficientes para las proteínas BAX y BAK (desde ahora nombrados como BAX/BAK DKO del inglés **Double Knock Out**) poseen una letalidad cercana al 90% debido a múltiples defectos en el desarrollo asociados a la inhibición de la apoptosis, incluyendo persistencia de uniones interdigitales, falla en el desarrollo del canal vaginal y acumulación de células en los sistemas nervioso y hematopoiético. Cabe destacar que ratones nulos para BAX o para BAK poseen un desarrollo normal, no tiene enfermedades asociadas con la edad, son reproductivamente aptos y no son letales, indicando que BAX y BAK presentan funciones muy similares y complementan sus actividades en la vía de apoptosis intrínseca (Lindsten et al., 2000). Además, fibroblastos embrionarios (MEFs, de las siglas en inglés **Mouse Embryonic Fibroblast**) extraídos de estos ratones DKO para BAX y BAK probaron ser altamente resistentes a múltiples estímulos apoptóticos incluyendo: estaurosporina (inhibe por competencia a las proteínas kinasas), radiación ultravioleta (provoca daño al ADN), etopósido (inhibe la topoisomerasa 2) y privación de suero entre otros (Wei et al., 2001). En este mismo trabajo fue demostrado que las células BAX/BAK DKO son altamente resistentes a la muerte inducida por agentes que afectan el RE, como son la taspigargina (inhibe el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa SERCA) y tunicamicina (inhibidor específico de la N-glicosilación). Ambas drogas provocan acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, provocando estrés de este organelo y un daño irreversible, gatillando consecuentemente la apoptosis.

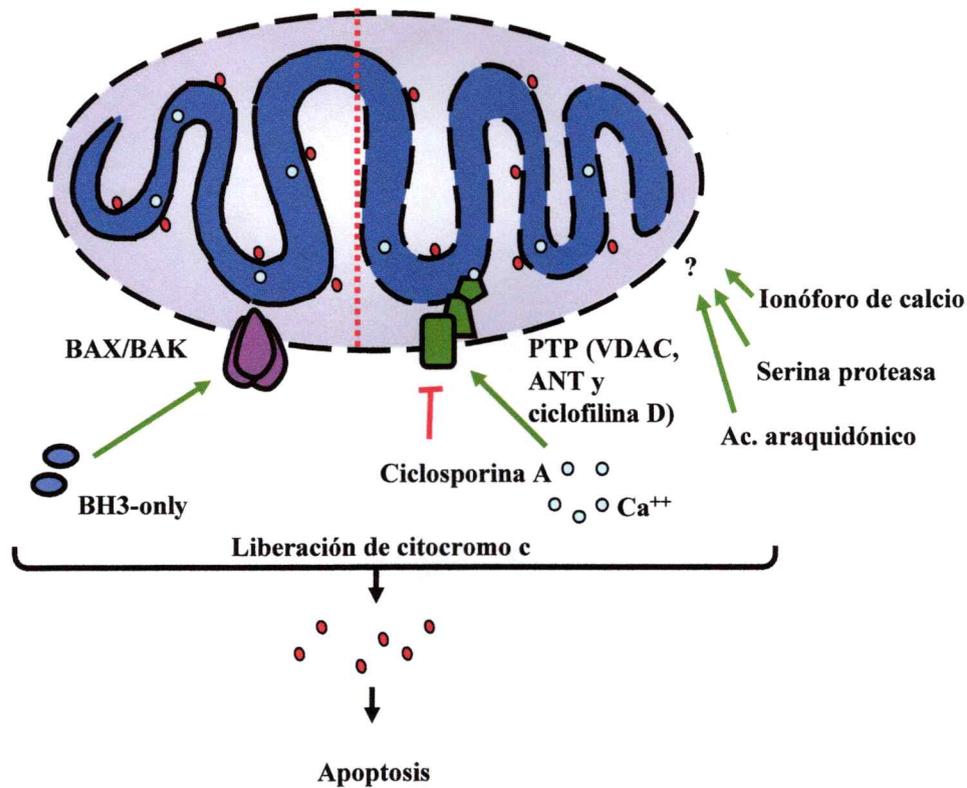


**Figura 1. Regulación de la apoptosis intrínseca.** (A) Los miembros de la familia BCL-2 poseen hasta 4 dominios de homología (BH1-BH4) entre ellos y pueden dividirse en dos grupos: pro- y anti-apoptóticos. Las proteínas pro-apoptóticas pueden subdividirse en miembros multidominio que conservan las regiones BH1-3, y en proteínas que sólo poseen el dominio BH3, llamados BH3-only. (B) En un estado basal sin estrés celular, las proteínas BH3-only activadoras como BIM y PUMA se encuentran inhibidas mediante su interacción con proteínas anti-apoptóticas como BCL-2. Además, BCL-2 inhibe la oligomerización de BAX/BAK en la mitocondria. Luego de un estímulo intrínseco de muerte celular, las proteínas BH3-only son reguladas positivamente tanto trascricional como post-traduccionalmente. En el caso de las proteínas BH3-only activadoras como BIM y PUMA, su inducción activa directamente a BAX y BAK en la mitocondria. Por otro lado, las proteínas BH3-only sensibilizadoras, como NOXA y BAD, desplazan la unión entre las proteínas anti-apoptóticas con las BH3-only activadoras. Esto libera a las proteínas BH3-only activadoras que luego producen la oligomerización de BAX/BAK en la membrana mitocondrial externa. Esto lleva a la translocación de citocromo c hacia el citoplasma, el que luego se une a APAF-1 y a pro-caspasa 9 en presencia de ATP, formando un complejo multiproteico llamado el apoptosoma. El apoptosoma media la activación de caspasas efectoras que ejecutan la apoptosis.

#### 1.4 Poro de transición permeable de la membrana mitocondrial.

La activación de BAX y BAK no es la única manera por la cual el citocromo c es liberado hacia el citoplasma para formar el apoptosoma. Otro mecanismo de liberación de citocromo c al citoplasma es a través del poro de transición permeable o PTP (del inglés Permeability Transition Pore), que al formarse en la mitocondria, provoca el ingreso de solutos y agua a la matriz mitocondrial. Esto lleva a una ruptura de la membrana interna y externa de la mitocondria por presión osmótica. De esta manera, ocurre una liberación de proteínas pro-apoptóticas como citocromo c desde la zona intermembrana de la mitocondria (Ow et al., 2008). Los componentes identificados del PTP son las proteínas VDAC (del inglés Voltage-dependent Anion Channel), ANT (del inglés Adenine Nucleotide Translocator) y ciclofilina D. VDAC, también es llamado porina mitocondrial que funciona como un canal dependiente de voltaje aniónico y se encuentra en la membrana mitocondrial externa. ANT es un transportador específico de ATP/ADP, que se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Asociada a este transportador, se encuentra en la matriz mitocondrial la chaperona con actividad peptidilprolil isomerasa, ciclofilina D. El PTP es regulado positivamente por calcio ( $Ca^{2+}$ ) (Grimm and Brdiczka, 2007). Además puede ser inhibido por ciclosporina A, que inhibe directamente a ciclofilina D, disminuyendo la muerte celular (Tsujimoto and Shimizu, 2007) (Figura 2). Estudios funcionales utilizando ratones nulos han demostrado solo para ciclofilina D un rol fundamental en la muerte celular (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Schinzel et al., 2005). El PTP es específicamente activado por estímulos dependientes de  $Ca^{+2}$  asociados a una sobrecarga de calcio en la matriz

mitocondrial. Estudios con células deficientes en ciclofilina D, demostraron que la ausencia de esta proteína no provocaba cambios en la muerte celular al ser incubadas con estímulos intrínsecos (tunicamicina, etoposido, brefeldina A, taspigargina y estaurosporina) y extrínsecos (TNF y TRAIL) (Schinzel et al., 2005). Sin embargo, una protección en las células nulas para ciclofilina D fue observada cuando se indujo estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en relación a su contraparte silvestre (WT). El  $H_2O_2$  induce liberación de calcio de los compartimentos intracelulares (Bootman et al., 2002; Scorrano et al., 2003). En este mismo estudio, fue demostrado que en ratones deficientes de ciclofilina D el tamaño del infarto cerebral se veía drásticamente reducido en modelos de isquemia, donde ocurre una recarga de  $Ca^{+2}$ . Es decir, ciclofilina D tendría un rol esencial en la muerte mediada por estrés oxidativo.



**Figura 2. Mecanismos de translocación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma durante la apoptosis.** Existen diferentes maneras de promover la translocación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma. Todas ellas llevan a la activación de la apoptosis a través de la formación del apoptosoma y la consecuente activación de caspasas efectoras. La vía clásica de liberación de citocromo c es a través de la activación conformacional de BAX y BAK, las que son reguladas positivamente por proteínas BH3-only. BAX y BAK al oligomerizar e insertarse en la membrana mitocondrial, inducen la permeabilidad específica de la membrana externa. Por otro lado, cuando se producen estímulos apoptóticos que aumentan los niveles de calcio en el citoplasma, se produce liberación de citocromo c por una recarga de calcio dentro de la mitocondria y la posterior ruptura por osmósis de las membranas mitocondrial interna y externa. Esta entrada de calcio y agua produce la apertura del poro de transición permeable (PTP), formado por las proteínas VDAC, ANT y ciclofilina D. El PTP es inhibido por ciclosporina A, un inhibidor específico de ciclofilina D. Por último, se ha demostrado la participación de un tercer mecanismo de liberación de citocromo c de identidad desconocida que es inducido por tratamientos con ácido araquidónico junto a ionóforos de calcio. Además, este poro es regulado negativamente por inhibidores de serinas proteasas.

### 1.5 Rol de la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas en la Apoptosis.

Diferentes perturbaciones generan un daño irreversible del RE, activando la apoptosis intrínseca. El RE tiene dos funciones principales entre otras. La primera es constituir el mayor compartimiento de almacenamiento de calcio. La segunda es el organelo donde se produce la maduración y el plegamiento de proteínas de la vía secretora. Ciertas condiciones, como la expresión de proteínas mutantes, disminución de calcio en el RE y cambios en el estado redox del RE, pueden interferir drásticamente con el proceso de plegamiento oxidativo de las proteínas en el lumen de este organelo. Esto desencadena la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, condición conocida como “estrés del RE” (Hetz and Glimcher, 2008).

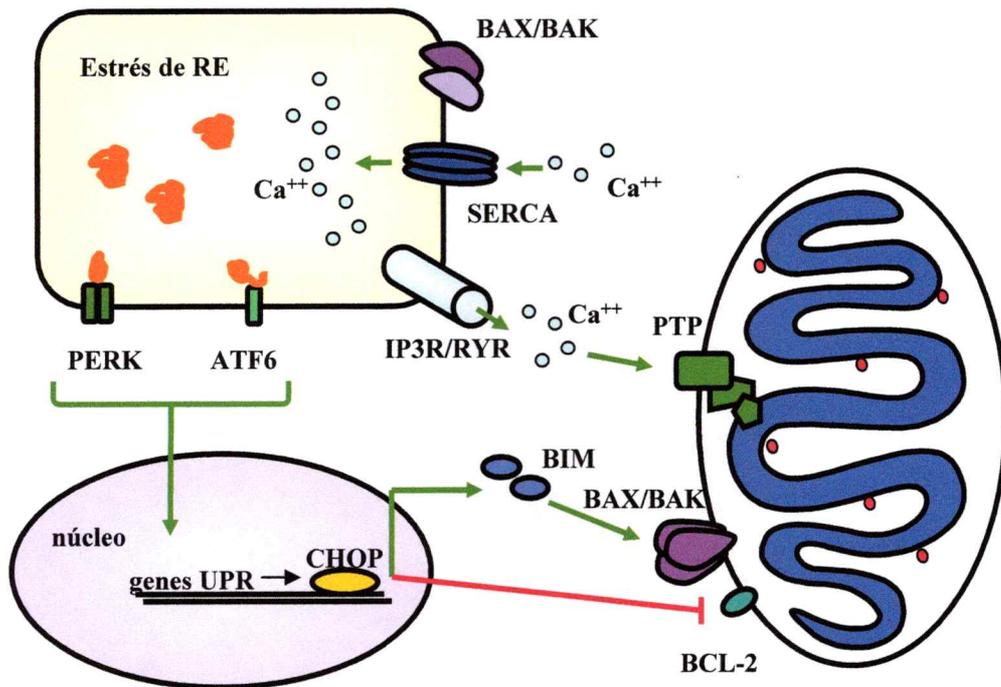
El mecanismo celular para aliviar este estrés es conocido como Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (o UPR de las siglas en inglés para **Unfolded Protein Response**). La UPR censa la acumulación inadecuada de proteínas mal plegadas gatillando complejos procesos adaptativos. Los sensores de estrés más estudiados son IRE-1 $\alpha$  (inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease), PERK (**PKR-like ER kinase**) y ATF6 (**activating transcription factor 6**). Estos sensores al ser activados controlan la expresión de múltiples genes que regulan el tamaño del RE y del Aparato de Golgi, la capacidad de plegamiento de proteínas, el control de la calidad de proteínas entre otras, reduciendo la sobrecarga de proteínas mal plegadas (Ron and Walter, 2007). Cuando el estrés de RE es crónico y la homeostasis no puede ser recuperada, la UPR conlleva a la apoptosis para eliminar la célula dañada. La señalización prolongada de la vía mediada por PERK lleva a la apoptosis producto de la inducción de un factor transcripcional

pro-apoptótico denominado CHOP ( C/EBP homologous protein), el que inhibe la expresión de *bcl-2* e induce la transcripción de *bim* (Lin et al., 2007; Marciniak et al., 2004; McCullough et al., 2001) (Figura 3).

### 1.6 Interacción Mitocondria/RE y su rol en la Apoptosis.

La mitocondria y el RE están interconectados tanto física como fisiológicamente. De hecho, cerca del 20% de la superficie mitocondrial está en contacto directo con el RE, donde ocurre una comunicación altamente regulada. Es en estos microdominios donde existe un traspaso de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el RE a la mitocondria a través de los canales de  $\text{IP}_3$  (inositol 1, 4, 5-trifosfato) (Rizzuto et al., 1998). La cantidad de calcio intercambiado desde el RE a la mitocondria es directamente proporcional a la concentración de calcio en el RE ( $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{RE}}$ ). Dos grupos independientes mostraron que BAX y BAK no solo se localizan en la mitocondria, sino también en la membrana del RE donde estas proteínas controlan la  $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{RE}}$  (Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2003). Por ejemplo, las células MEFs BAX/BAK DKO presentan bajas  $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{RE}}$ , por lo tanto poco  $\text{Ca}^{+2}$  es liberado hacia el citoplasma bajo estimulación en estas células. En consecuencia la recarga de calcio mitocondrial es baja en estas células BAX/BAK DKO. Debido a esta razón, la activación del PTP en la mitocondria está también disminuida en estas células, presentando una resistencia frente a la apoptosis mediada por estímulos dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  liberado del RE como son el ácido araquidónico, ceramidas o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los autores demostraron en forma elegante que mediante la sobreexpresión de la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  del RE, SERCA, fue posible restablecer los niveles normales de  $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{RE}}$ . Esta estrategia

reconstituyó la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  por la mitocondria y la sensibilidad de estas células frente a muerte asociada con liberación de calcio y apertura del PTP. Es importante destacar que la sobreexpresión de SERCA no afectó la resistencia de las células BAX/BAK DKO frente a la apoptosis inducida por estrés de RE, lo que permitió disectar finamente ambas vías. Sólo la expresión de BAX específicamente en la mitocondria restableció la sensibilidad de estas células DKO frente a la apoptosis intrínseca asociada al estrés en el RE. Estos resultados se explicarían por el hecho de que la inducción transcripcional de proteínas BH3-only bajo condiciones de estrés de RE converge en la activación de BAX y BAK en la mitocondria, gatillando así la apoptosis (Figura 3). En cambio, la sobrecarga de calcio en la mitocondria por si sola induce la liberación de citocromo c en forma independiente de BAX/BAK (Rimessi et al., 2008). Estos resultados en conjunto sugieren que existe una comunicación entre el RE y la mitocondria en la regulación de la apoptosis, una mediada por la inducción de las proteínas BH3-only y la activación de BAX y BAK y otra por la apertura del PTP producto de la sobrecarga de calcio en la mitocondria (Figura 3).



**Figura 3. Apoptosis dependiente de estrés de RE. Ciertas condiciones desencadenan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, estado conocido como "estrés del RE".** El mecanismo celular para aliviar este estrés es conocido como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Sin embargo, bajo estrés crónico la UPR lleva a apoptosis. Sensores de la UPR como PERK y ATF6 activan al factor transcripcional CHOP, que disminuye los niveles de expresión de *bcl-2* y regula además positivamente los niveles de transcripción de *bim*. Este desbalance entre proteínas anti- y pro-apoptóticas lleva a la apoptosis a través de la activación de BAX/BAK en la mitocondria. Por otro lado, el nivel de calcio en el lumen del RE es regulado a través de la bomba calcio ATPasa SERCA, de BAX/BAK/BCL-2 en el RE, además de canales como el receptor de IP3 (IP3R) y el receptor de rianodina (RYR). Bajo estímulos que provocan liberación de calcio desde el RE a través del IP3R, se producirá apoptosis mediada por PTP, e independiente de BAX/BAK en la mitocondria. Mientras mayor sean los niveles de calcio luminare del RE en estado estacionario, habrá mayor liberación de este bajo estimulación, y por ende un aumento en la sobrecarga de calcio en la mitocondria.

### 1.7 ¿Vías apoptóticas intrínsecas independientes de BAX/BAK y PTP?

Las proteínas multidominio BAX y BAK son el núcleo donde convergen diferentes estímulos apoptóticos que, finalmente, llevan a la liberación de citocromo c desde la mitocondria, produciendo muerte celular. Sin embargo, como ya se mencionó, los ratones doble deficientes para esas proteínas tienen una sobrevivencia del 10%. Es decir, en ausencia de BAX y BAK existirían mecanismos que, independiente de estas proteínas, pueden suplir esta deficiencia y llevar a la muerte celular en el desarrollo, con la consecuente sobrevivencia del ratón hacia la adultez.

Como se mostró anteriormente, las células BAX/BAK DKO son resistentes a diferentes estímulos intrínsecos de apoptosis. Sin embargo, en un trabajo reciente de Mizuta y colaboradores, las células BAX/BAK DKO presentaron muerte dependiente de la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, es decir, muerte a través de apoptosis intrínseca. La liberación de citocromo c desde las mitocondrias de estas células se produjo al ser incubadas con una combinación de un ionóforo de calcio y ácido araquidónico (ArA) (Mizuta et al., 2007). Esta muerte fue revertida por inhibidores de serina-proteasas pero no por la sobre-expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2. En este estudio se descartó la participación del PTP en la muerte celular, ya que al incubar células triple deficientes en BAX, BAK y ciclofilina D con la combinación ionóforo/ArA, estas células presentaron muerte celular similar a su contraparte BAX/BAK DKO. Por lo tanto, en este trabajo se demostró la existencia de una vía de apoptosis que produce liberación de citocromo c independiente de BAX, BAK y PTP, sugiriendo la posibilidad de que exista otro mecanismo de

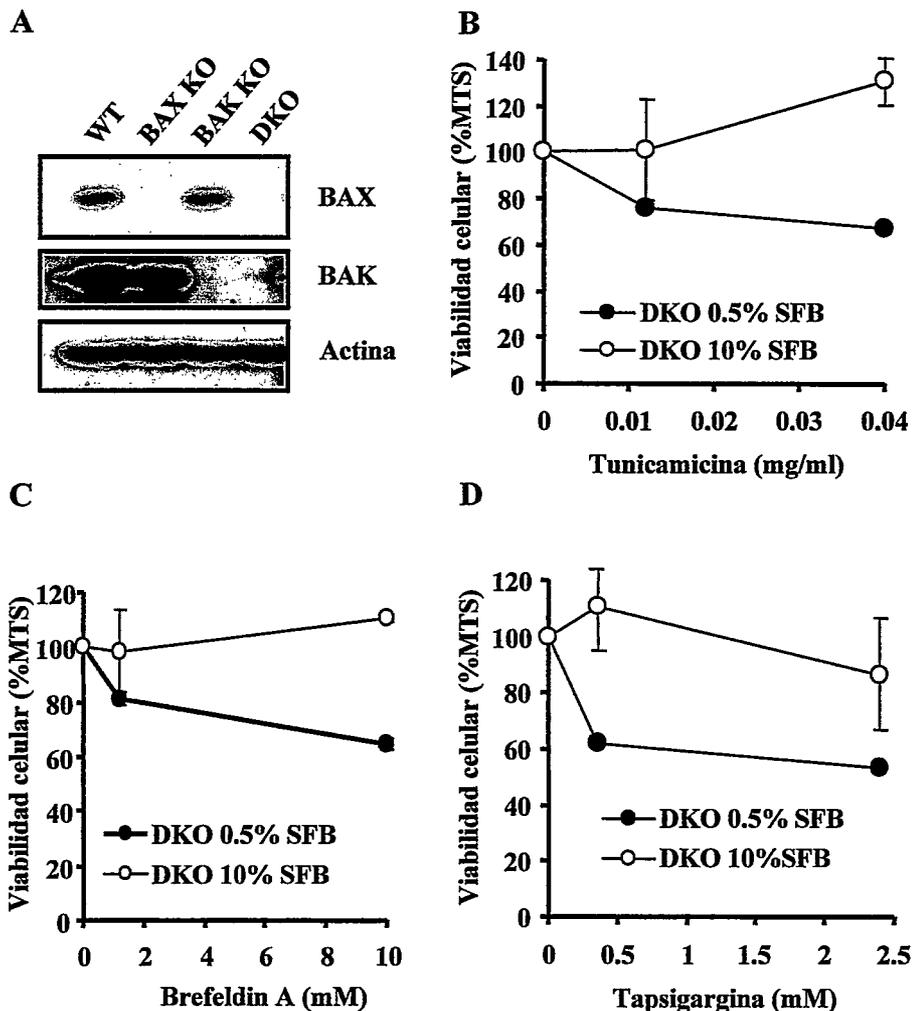
apoptosis intrínseco, es decir, un tercer poro, el que es gatillado por la combinación de ionóforo de calcio y ArA y dependiente de serina-proteasas. Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito otros estímulos que induzcan apoptosis independiente de BAX/BAK y ciclofilina D (PTP).

En nuestro laboratorio hemos observado que al incubar las células BAX/BAK DKO con estresores de RE en medio con 0,5% de suero (privación de suero) se produce muerte celular en forma dosis dependiente de diferentes estresores de RE.

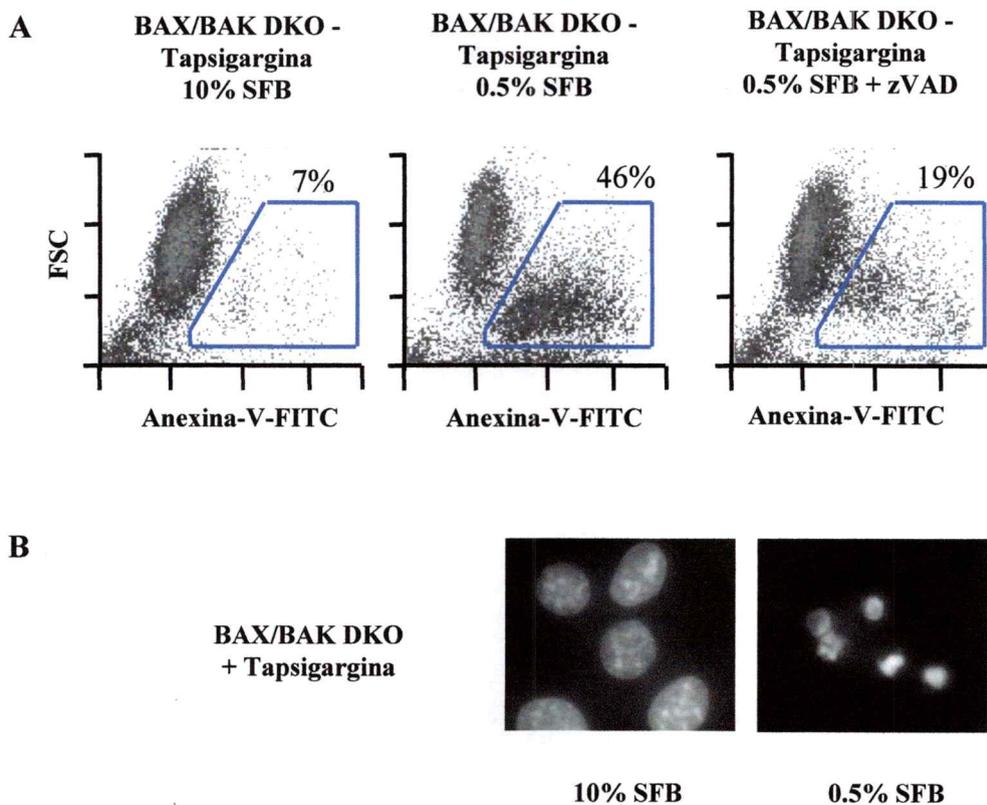
Al incubar las células BAX/BAK DKO con estresores clásicos de RE como tunicamicina, tapsigargina y brefeldina A, las células BAX/BAK DKO presentaron resistencia a la muerte como ya se ha publicado. Sin embargo, al reducir el porcentaje de suero presente en el medio de cultivo a 0,5%, estas células sufrieron muerte celular (Figura 4A, B, C y D). Estos resultados fueron obtenidos mediante ensayos de daño mitocondrial y análisis de la permeabilidad de la membrana plasmática mediante la tinción con ioduro de propidio (PI). En esta tesis proponemos estudiar el mecanismo involucrado en la muerte de células BAX/BAK DKO y definir la posible participación de ciclofilina D en el proceso. Como antecedentes preliminares de esta tesis determinamos si la muerte celular bajo la combinación de estresores es debida a apoptosis determinado por la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular por tinción con Anexina-V-FITC, una baja en el volumen celular por ensayos de citometría de flujo y la visualización de la condensación de núcleo celular en ensayos con tinción Hoechst (Figura 5A y B). Además, observamos que esta muerte celular es revertida en parte mediante el pre-tratamiento de las células con un inhibidor de caspasas generales (zVAD-fmk) (Figura 5A). Todos estos marcadores moleculares y patrones morfológicos

nos permitieron definir que la muerte inducida en condiciones de estrés de RE y privación de suero se debe a la activación de la apoptosis.

Basados en los antecedentes descritos, en este proyecto decidimos caracterizar en detalle el mecanismo que lleva a la muerte de las células doble deficientes para BAX y BAK en condiciones de estrés de RE y privación de suero. En esta tesis nos centraremos en estudiar los factores que gatillan esta muerte celular, en definir cuál es la vía por la se produce la activación de las caspasas y cuales son los elementos celulares que la regulan.



**Figura 4. La privación de suero recupera la susceptibilidad de las células BAX/BAK DKO a la muerte celular inducida por estrés de RE.** (A) Los niveles de expresión de las proteínas BAX y BAK fueron determinadas en células MEFs WT, deficientes en BAX (BAX KO), deficientes en BAK (BAK KO) y doble deficientes para estas proteínas (DKO) mediante análisis de Western blot de extractos de proteínas totales. Como control de carga fueron analizados los niveles de actina. (B, C y D) Gráficos de viabilidad celular medida en células BAX/BAK DKO tratadas en presencia de 10% y 0,5% de suero con las concentraciones indicadas de (B) tunicamicina, (C) brefeldina A y (D) tapsigargina por 16 horas, y luego analizadas a través de ensayos con MTS (del inglés 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium) relativa a células controles no tratadas. Los resultados representan promedios y desviación estándar de tres determinaciones.



**Figura 5. Inducción de marcadores clásicos de apoptosis en células BAX/BAK DKO en condiciones de estrés de RE y privación de suero.** (A) Las células BAX/BAK DKO fueron pre-tratadas con o sin inhibidores de caspasas (10  $\mu$ M de zVAD-fmk) durante 30 minutos en medio de cultivo preparado con alto (10%) o bajo (0,5%) suero. Luego las células fueron incubadas con 10  $\mu$ M de tapsigargina por 12 horas. Posteriormente, los niveles de exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática fueron determinados mediante tinción con anexina-V-FITC y análisis por citometría de flujo. Los gráficos muestran la señal de fluorescencia versus el volumen celular (FSC) como medida adicional de apoptosis (disminución de FSC). Estos resultados representan tres experimentos independientes en donde se midieron 5000 eventos por muestra. (B) Las células BAX/BAK DKO fueron expuestas a tapsigargina por 16 horas en presencia de 10% ó 0,5% de suero en el medio de cultivo. Luego, la morfología nuclear fue observada a través de la tinción del ADN con Hoechst mediante su visualización a través de un microscopio de epifluorescencia.

## **2. Hipótesis.**

Las células MEFs doble deficientes para BAX y BAK desarrollan apoptosis intrínseca independiente de BAX, BAK y ciclofilina D al ser expuestas a condiciones de privación de suero y estrés de RE.

### **2.1 Objetivo General.**

Estudiar los mecanismos celulares que están involucrados en la muerte por apoptosis de células doble deficientes para BAX y BAK expuestas a condiciones de privación de suero y estrés de RE.

### **2.2 Objetivos Específicos.**

- 1) Caracterizar el mecanismo de muerte celular, analizando otros marcadores de apoptosis intrínseca en células BAX/BAK DKO.
- 2) Determinar si los efectos observados en células BAX/BAK DKO son específicos para el estrés de RE o si se observan con otros tipos de estrés celular.
- 3) Estudiar la posible participación del PTP en la apoptosis de células BAX/BAK DKO.

### **3. Materiales y Métodos.**

#### **3.1 Reactivos.**

Las sales, ácidos, bases, detergentes, bromuro de etidio y solventes utilizados de grado analítico o de biología molecular, fueron obtenidos en Merck y Sigma. La agarosa ultrapura-1000, ADN estándar y enzimas Taq ADN polimerasa, Fluoruro de Sodio, Ortovanadato de Sodio e inhibidores de fosfatasa fueron obtenidas de Invitrogen, New England Biolabs y Promega, respectivamente. El reactivo Micro BCA para cuantificar proteínas y sustrato para quimioluminiscencia fue obtenida en Pierce. El cóctel de inhibidores de proteasas se obtuvo de Roche. Las películas fotográficas de radiografía fueron obtenidas de Fuji. La procedencia de los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-Citocromo-c de Pharmigen, anti-SERCA de Affinity Bioreagents, anti-HSP90 y anti-actina de Santa Cruz Biotechnology, anti-HA de Roche. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP fueron obtenidos de Amersham Biosciences.

Tunicamicina (Tm), Brefeldina A, Tapsigargina, TNF- $\alpha$ , zVAD-fmk, ceramidas y ciclosporina A fueron obtenidos de Calbiochem EMB Bioscience Inc. Etoposido, Nocodazole y Taxol fueron adquiridos en Molecular probes y Sigma Aldrich. El medio de cultivo celular y los antibióticos fueron obtenidos de Invitrogen. El suero fetal bovino es de Life Technologies. El marcador Ioduro de Propidio fue adquirido en Promega. La tinción de [DIOC<sub>6</sub>(3)] fue obtenida en Molecular Probes.

### **3.2 Líneas celulares.**

Las células MEFs transformadas con SV40 doble deficientes para BAX y BAK y las células controles silvestres fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Stanley Korsmeyer y su generación y cultivo han sido previamente descritos (Cheng et al., 2001). Las células doble nulas para BAX y BAK que expresan BAX destinado a mitocondria o SERCA fueron descritas por Scorrano (Scorrano et al., 2003). Las células MEFs nulas para BIM o PUMA y las doble deficientes para BIM y PUMA fueron generosamente cedidas por la Dra. Emily Cheng. Las células HEK293 y HEK293T $\psi$  utilizadas fueron adquiridas de ATCC (The Global Bioresource Center).

### **3.3 Cultivo Celular.**

Las células fueron mantenidas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina y 10  $\mu$ M de aminoácidos no esenciales en el caso del cultivo de las células MEFs.

### **3.4 Generación de líneas celulares estables de shRNAs mediante infección lentiviral.**

Las células HEK293T fueron sembradas a una concentración de  $0.35 \times 10^6$  células/ml y luego de 24h fueron transfectadas con el reactivo Efectene de Qiagen según el protocolo recomendado por el fabricante. Los constructos para la expresión lentiviral

que codifican para los diferentes shARN (small hairpin ARN) fueron generados por el Broad Institute (Boston, USA), basándose en diferentes criterios para su diseño (para mayor información ver [http://www.broad.mit.edu/genome\\_bio/trc/rnai.html](http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/rnai.html)). El plasmidio de expresión de shARN usado fue pLKO.1, el que posee secuencias que codifican para shARNs bajo el promotor U6 y además posee resistencia al antibiótico puromicina. Con el objetivo de producir partículas lentivirales, células HEK293T fueron transfectadas con el plasmidio pLKO.1 junto con los plasmidios  $\Delta$ 8.9 (plasmidio que contiene los genes *gag*, *pol* y *rev*, necesarios para la replicación viral) y VSV-G (plasmidio que contiene secuencias codificantes de la envoltura viral). Como control se utilizó un constructo lentiviral que codifica para un shARN contra el ARNm de *luciferasa*. Después de 48 horas de transfección, el sobrenadante de estas células fue filtrado en filtros de 0.45  $\mu$ m y posteriormente agregado a células MEFs para su infección en la presencia de 10  $\mu$ g/mL de polybreen. Luego de 24 horas, las células fueron crecidas en medio de cultivo con 3  $\mu$ g/mL de puromicina para la selección de las células infectadas. De esta manera fueron generadas la línea de MEFs doble deficiente en BAX y BAK con silenciamiento del ARNm de ciclofilina D (BAX/BAK DKO shCiclofilinaD) (Figura 12A). Para cada experimento fueron utilizados cinco constructos de shARN para cada gen y posteriormente fue seleccionado el constructo con mayor eficiencia de silenciamiento a través del análisis de los niveles de expresión de la proteína mediante Western blot o a través de PCR en tiempo real de ADNc (ADN complementario) total utilizando partidores específicos para cada gen (ver más adelante).

### **3.5 Expresión transiente de proteínas BH3-only en MEFs.**

Los vectores bicistronicos pMSCV con secuencias codificantes para t-BID-HA, PUMA-HA, NOXA-HA y BAD-HA y GFP fueron descritos anteriormente en la literatura (Kim et al., 2006). Estos constructos fueron transfectados junto al vector empaquetador  $\psi$  en células HEK293T $\psi$  de acuerdo a las recomendaciones descritas en la literatura (Cheng et al., 2001). Luego de 48 horas luego de la transfección, el medio de estas células fue colectado y filtrado en filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y agregado sobre células MEFs (WT y BAX/BAK DKO) en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polybreen (Figura 10A). La eficiencia de transfección se midió a través de ensayos de western blot contra el epítotope HA de estas proteínas de fusión. La eficiencia de infección se analizó por el porcentaje de células con GFP a través de ensayos de citometría de flujo (se contaron 5000 eventos por muestra).

### **3.6 Ensayo de muerte en células con bajo suero y en condiciones de estrés.**

Para analizar la muerte celular, las células MEFs de diferentes genotipos fueron crecidas en placas de 24 pocillos a una concentración de  $0,1 \times 10^6$  células/mL. Luego de 24 horas el suero presente en el medio de cultivo fue disminuido a 0,5% por 2 horas, estado que de ahora en adelante llamaremos como privación de suero. El control WT se mantuvo con 10% suero. Pasada estas dos horas se incubaron las células con diferentes estresores celulares: Tunicamicina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Tapsigargina (10  $\mu\text{M}$ ), Etoposido (50 $\mu\text{M}$ ), Taxol (5 $\mu\text{M}$ ), Nocodazole (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Actinomicina D (1 $\mu\text{M}$ ). En ciertos casos, previo a la incubación con estos estresores, las células fueron preincubadas

durante media hora con Ciclosporina A (1 $\mu$ M). Después de 24 horas, tanto el medio como las células en la placa fueron colectados y se les incubó con 2 $\mu$ g/mL de Ioduro de Propidio (PI). Luego, las células PI positivas fueron medidas por citometría de flujo y analizadas con el programa WinMDI2.9. Fueron medidos 5000 eventos y el porcentaje de células PI positivas fue calculado considerando 100% al total de células que arbitrariamente cumplían con un tamaño celular determinado (Figura 7A).

Para los ensayos de expresión transiente de proteínas BH3-only, células WT y BAX/BAK DKO fueron infectadas con retrovirus y luego de 8 horas las células fueron incubadas en presencia de 10 y 0,5% de suero. Para este ensayo, las células no se incubaron con estresores y la muerte celular fue medida después de 16 horas de acuerdo a lo arriba descrito.

### **3.7 Liberación de Citocromo c.**

Con el objetivo de estudiar la redistribución subcelular de citocromo c, las células BAX/BAK DKO fueron tratadas con 12  $\mu$ g/ml de tunicamicina por 16 horas en presencia de medio con 10% y 0,5% de suero. Posteriormente, estas células fueron lavadas tres veces con PBS a 4°C y luego fueron fijadas en hielo durante 30 minutos con paraformaldehído al 4%. A través de un ensayo de inmunofluorescencia previamente descrito (Hetz et al., 2005a; Hetz et al., 2005b), las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-citocromo c (1:200 por 2 horas). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal y procesadas con el programa IP lab v 4.04.

### **3.8 Potencial Mitocondrial.**

Para investigar el estado del potencial mitocondrial en condiciones de estrés de RE y 0,5% de suero, las células WT y BAX/BAK DKO fueron estresadas con tunicamicina 12µg/mL por 8 horas en medio con 10% y 0,5% de suero. Luego fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C en presencia de 80 nM de DIOC<sub>6</sub>(3) (3,3'-dihexiloxacarbocianin yoduro). La pérdida de la marca del DIOC<sub>6</sub>(3) fue observada mediante citometría de flujo.

### **3.9 Extracción de RNA, RT-PCR y PCR en tiempo real.**

El ARN total fue preparado a partir de células MEFs utilizando TRIzol<sup>®</sup> según el protocolo del fabricante. Luego se sintetizó el ADNc con el kit iScript cDNA Síntesis de BIORAD, utilizando el siguiente programa: 5 min. a 25 °C, 45 min. a 44 °C y 5min. a 85 °C.

Realizamos reacciones cuantitativas de PCR en tiempo real utilizando el reactivo fluorescente SYBRgreen y la enzima ADN polimerasa GO Taq<sup>®</sup> Flexi (Promega) en un sistema ABI PRISM 7700 de Applied Biosystems. Las cantidades relativas de ARNm fueron calculadas a partir de los valores del ciclo umbral comparativo usando actina como control interno. Los partidores fueron diseñados utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) u obtenidos de la base de datos de partidores:

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>

Realizamos PCR en tiempo real usando los pares de partidores que se muestran a en la tabla 1.

Tabla 1: partidores para PCR cuantitativo.

Gen	Partidor en sentido directo	Partidor en sentido inverso
Bim	5'-CGACAGTCTCAGGAGGAACC-3'	5'-CATTTGCAAACACCCTCCTT-3'
Puma	5'-GCCCAGCAGCACTTAGAGTC-3'	5'-GGTGTCGATGCTGCTCTTCT-3'
Noxa	5'-GGAGTGCACCGGACATAACT-3'	5'-TTGAGCACACTCGTCCTTCA-3'
Ciclofilina D	5'-GGGACAGGTGGCGAAAGTATT-3'	5'-TTCGTATTGGGGCCTGCATT-3'
Actina	5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

### 3.10 Análisis de Western Blot.

Para este análisis, las células fueron colectadas y homogenizadas mediante sonicación en solución tampón RIPA en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). La concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo de micro-BCA. El equivalente a 30-50µg de proteína total fue cargado en geles de 12 o 15% de poliacrilamida preparados según la literatura (Laemmli, 1970).

Los siguientes anticuerpos y diluciones fueron utilizados: anti-HSP90 1:1000, anti-SERCA 1:1000 y anti-HA 1:1000. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP fueron utilizados a una dilución de 1:4000.

#### **4. Resultados.**

##### **4.1 Las células BAX/BAK DKO experimentan reducción del potencial mitocondrial y liberación de citocromo c bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero.**

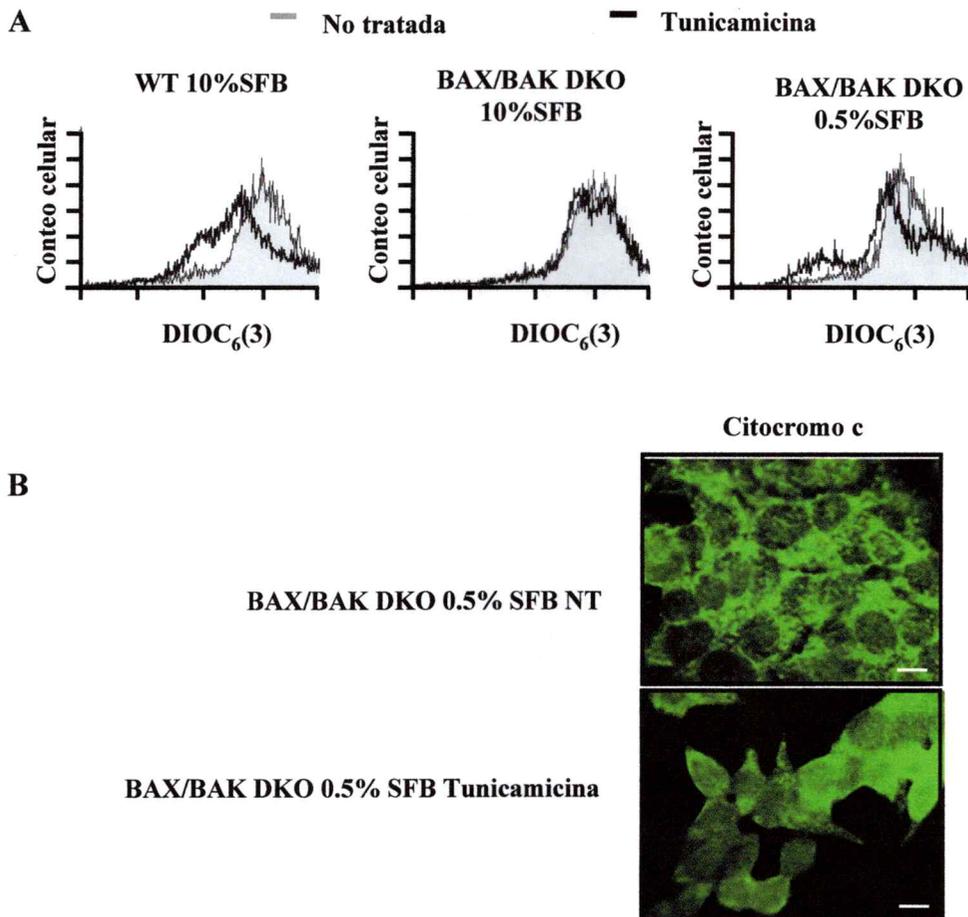
En ensayos preliminares de nuestro laboratorio fue determinado que las células doble deficientes para BAX y BAK sufren diferentes cambio morfológicos y bioquímicos cuando son sometidas a condiciones de estrés de RE en presencia de medio con 0,5% de suero. Basado en diferentes ensayos fue posible definir que en estas condiciones de estimulación las células presentaron: encogimiento del núcleo celular, exposición de fosfatidilserinas al exterior de la membrana plasmática, participación de caspasas en la muerte, y la disminución del volumen celular (Figura 5A y B). Todos estos resultados en conjunto nos indicaron que la muerte producida por la combinación de estrés de RE y privación de suero en células BAX/BAK DKO es por apoptosis.

Sin embargo, quisimos explorar otros marcadores apoptóticos para definir y caracterizar a cabalidad el mecanismo de muerte celular (intrínseco o extrínseco). De esta manera, decidimos pesquisar dos aspectos celulares fundamentales en el proceso de apoptosis: decaimiento del potencial mitocondrial y liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma.

Al incubar las células WT y BAX/BAK DKO con tunicamicina en condiciones normales de suero (10%), sólo las células silvestres sufrieron un descenso en el potencial mitocondrial, el que fue medido a través de la pérdida de marca de DIOC<sub>6</sub>(3) (Figura 6A). Esta sonda es acumulada en la mitocondria en forma proporcional al potencial de

su membrana y es liberado cuando el potencial mitocondrial se pierde. Las células BAX/BAK DKO bajo estas mismas condiciones no presentaron alteraciones en el marcaje con DIOC<sub>6</sub>(3) (Figura 6A). Sin embargo, luego de bajar a 0,5% los niveles de suero, las células BAX/BAK DKO mostraron una disminución parcial del potencial mitocondrial, lo que indica alteraciones en la mitocondria debido a las condiciones de estrés de RE y privación de suero (Figura 6A).

Por otro lado, la redistribución subcelular de citocromo c fue medida a través de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Células BAX/BAK DKO fueron fijadas luego de ser estimuladas con privación de suero y con una combinación de privación de suero y exposición a tunicamicina. Posteriormente, fueron teñidas utilizando un anticuerpo anti-citocromo c. Las células BAX/BAK DKO tratadas con 0,5% de suero pero sin adicionar estresores de RE presentaron un patrón punteado de citocromo c (Figura 6B). No obstante, cuando estas células fueron incubadas con una combinación de tunicamicina y privación de suero, observamos una redistribución del citocromo c en las células asociado a un patrón difuso del color verde (Figura 6B).

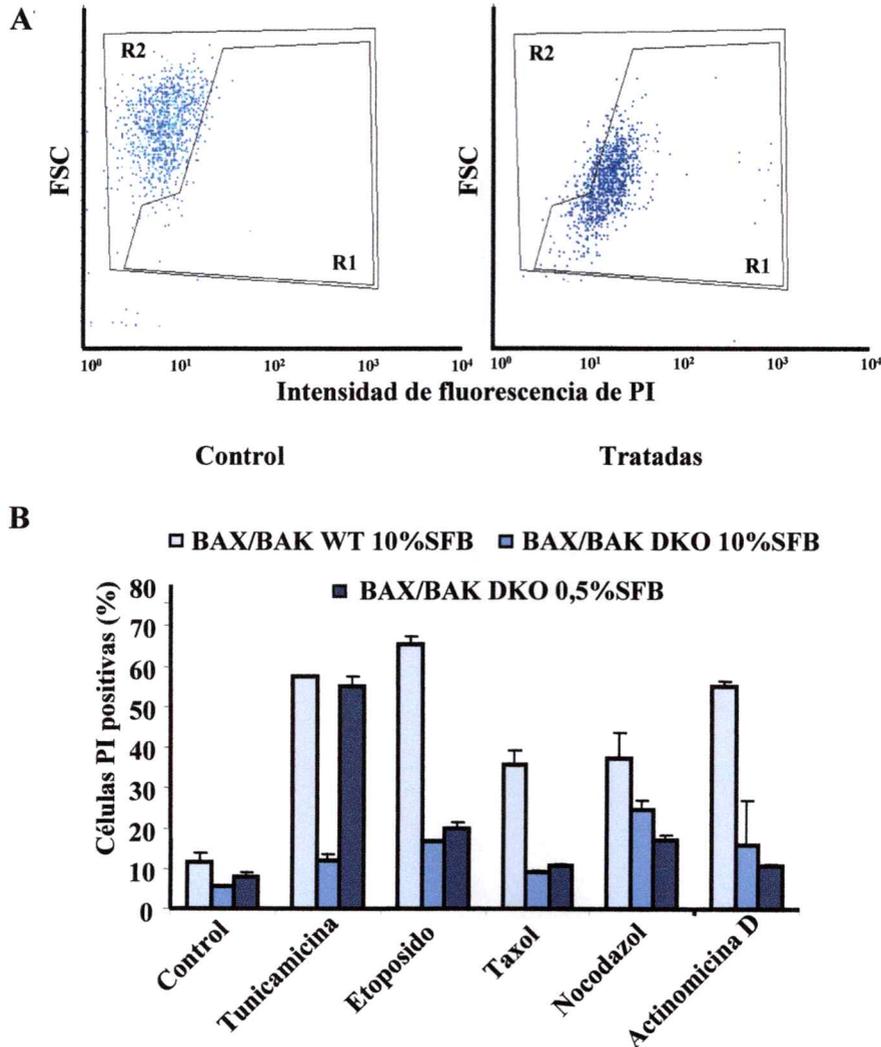


**Figura 6: Caracterización de la muerte celular a través de la medición de marcadores clásicos de apoptosis.** (A) Las células WT y BAX/BAK DKO fueron preincubadas con 0,5% o 10% de SFB por 2 horas. Luego, estas células fueron tratadas con 10 $\mu$ g/mL de tunicamicina por 8 horas y posteriormente las células fueron incubadas con 80 nM de DIOC6(3) por 15 minutos. La actividad mitocondrial (intensidad de fluorescencia de DIOC6(3)) fue medida mediante citometría de flujo. Un histograma representativo de número de células versus intensidad de fluorescencia es presentado. (B) La localización subcelular de citocromo c (verde) fue observada a través de ensayo de inmunofluorescencia indirecta en células BAX/BAK DKO. Estas células fueron privadas de suero (0,5%) por 2 horas y luego tratadas o no (NT) por 16 horas con 10  $\mu$ g/mL de tunicamicina (barra: 20  $\mu$ m).

#### **4.2 La susceptibilidad de las células BAX/BAK DKO a la muerte mediada por estrés celular y privación de suero es específica para estímulos que perturban la homeostasis del RE.**

Con el objetivo de estudiar la especificidad de la muerte observada en las células BAX/BAK DKO respecto al estímulo empleado, decidimos realizar ensayos de muerte celular con diferentes estresores celulares no relacionados con estrés de RE. La muerte celular fue medida a través de la incorporación de yoduro de propidio (PI) a las células muertas, y su posterior cuantificación por citometría de flujo (Figura 7A). Además, la disminución del volumen celular puede ser evaluada en este análisis como parámetro de apoptosis (Figura 7A). Las células WT y BAX/BAK DKO fueron incubadas con niveles normales de suero (10%) y con niveles bajos de suero (0,5%) en el medio de cultivo. En estas condiciones, las células fueron tratadas con etopósido (provoca daño al ADN a través de la inhibición de la topoisomerasa 2), taxol y nocodazol (ambas drogas desregulan la dinámica microtubular) y con actinomicina D (un inhibidor de la transcripción). Como fue esperado, las células WT sufrieron apoptosis bajo estas condiciones, reflejado en un alto porcentaje de células PI positivas (Figura 7B). Por otro lado, las células BAX/BAK DKO fueron resistentes a entrar en apoptosis cuando fueron tratadas con los diferentes estresores celulares bajo condiciones normales de suero como se ha descrito anteriormente (Wei et al., 2001). Sin embargo, para nuestra sorpresa, la resistencia de las células BAX/BAK DKO a la muerte a través de estos estresores no fue revertida al incubarlas en un medio de cultivo con 0,5% de suero (Figura 7B). Es decir, la muerte de las células BAX/BAK DKO en medio con 0,5% de suero solo fue

observada bajo condiciones de estrés de RE y no a través de otros estímulos de muerte intrínseco.



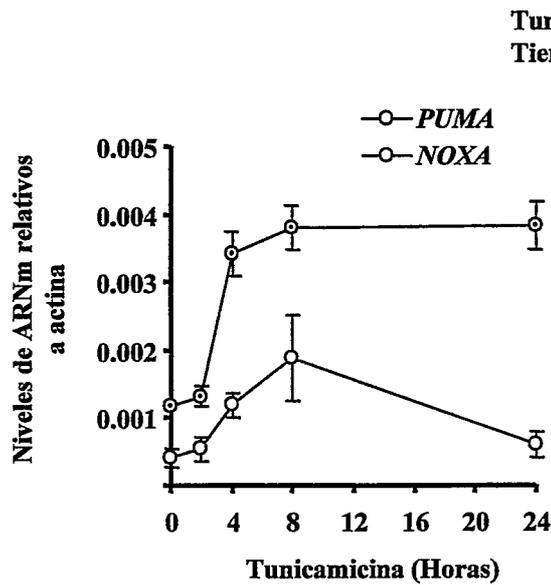
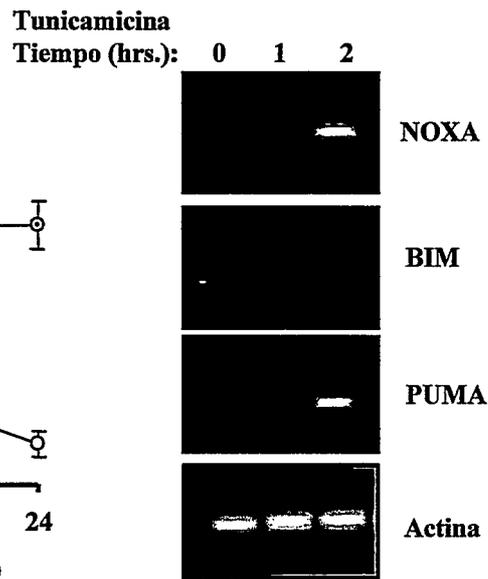
**Figura 7:** La apoptosis de las células BAX/BAK DKO ocurre específicamente bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero y no bajo otros estímulos intrínsecos de muerte celular. (A) Ejemplo de gráfico de densidad celular representativo, realizado a partir de la medición del volumen celular relativo (FSC) y la tinción de células muertas con yoduro de propidio (PI) obtenido por citometría de flujo. La región seleccionada como células positivas para PI y bajo volumen es indicada como R1. El porcentaje de muerte celular se calcula con respecto a la población total representada por R2. (B) Las células WT y BAX/BAK DKO fueron privadas de suero (0,5%) durante 2 horas para luego ser tratadas con las distintas drogas que inducen apoptosis intrínseca interrumpiendo diferentes procesos celulares: 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina, 20  $\mu\text{M}$  de etoposido, 1  $\mu\text{M}$  de taxol, 10  $\mu\text{M}$  de nocodazol o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de actinomycin D. Luego de 24 horas de tratamiento, la viabilidad celular fue medida mediante la incorporación de PI a las células muertas por citometría de flujo tal como se muestra en (A). El gráfico representa promedios y desviaciones estándar de un experimento representativo (5000 eventos por muestra) de dos o más experimentos independientes para cada estresor.

### **4.3 La muerte de las células BAX/BAK DKO bajo condiciones de privación de suero y estrés de RE es independiente de las proteínas BH3-only.**

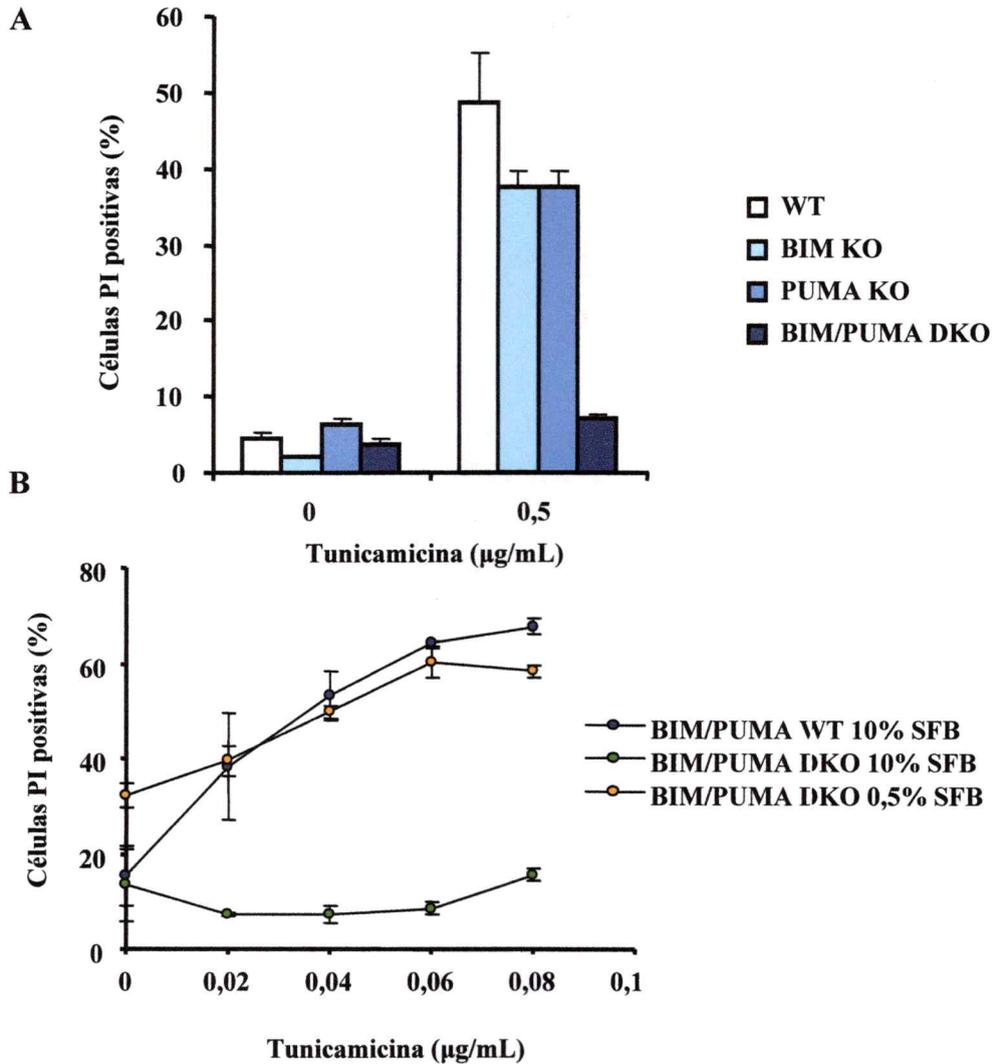
Diferentes proteínas BH3-only son inducidas por estrés de RE mediando la inducción de la apoptosis. Por ejemplo, los niveles de BIM, PUMA y NOXA son aumentados a nivel transcripcional bajo condiciones de estrés de RE irreversible (Futami et al., 2005; Li et al., 2006; Puthalakath et al., 2007). Con el objeto de comprobar estos datos de la literatura en nuestro modelo celular, las células MEFs WT fueron incubadas con el estresor tunicamicina por diferentes períodos de tiempo y luego los niveles de expresión del ARNm de las proteínas BH3-only BIM, PUMA y NOXA fueron medidas por PCR en tiempo real. De manera complementaria, un PCR convencional semi-cuantitativo fue realizado para monitorear la expresión de estos genes en un gel de agarosa. Los resultados indicaron que los niveles de expresión de los tres genes fueron aumentados en el tiempo en respuesta a estrés de RE (figura 8A y B), corroborando estudios previos (Futami et al., 2005; Li et al., 2006; Puthalakath et al., 2007; Reimertz et al., 2003).

Por otro lado, las células deficientes en BIM (BIM KO) o PUMA (PUMA KO) fueron levemente resistentes a la muerte inducida por estrés de RE en comparación con su contraparte WT en ensayos de viabilidad (Figura 9A). Sin embargo, una elevada resistencia a la muerte inducida por estrés de RE fue observada en células doble deficientes para BIM y PUMA (BIM/PUMA DKO) (Figura 9A). Esto da cuenta de que las proteínas BH3-only activadoras actúan de manera concertada para inducir la

apoptosis, donde la combinación de la deficiencia de BIM y PUMA produce una resistencia muy alta frente a la muerte celular producto del estrés de RE.

**A****B**

**Figura 8: Los niveles de ARNm de las proteínas BH3-only BIM, PUMA y NOXA son inducidos en condiciones de estrés de RE.** Los niveles relativos de ARNm de NOXA y PUMA fueron determinados en células MEFs WT luego de incubarlas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamicina por diferentes tiempos. La determinación de los niveles de ARNm fue realizado a través de PCR cuantitativo utilizando cDNA total (A) y PCR semi-cuantitativo convencional (B) con partidores específicos diseñados contra genes que codifican para las proteínas BH3-only BIM, PUMA y NOXA. Los niveles de ARNm de actina fueron determinados en cada muestra y utilizados para normalizar los valores en (A).

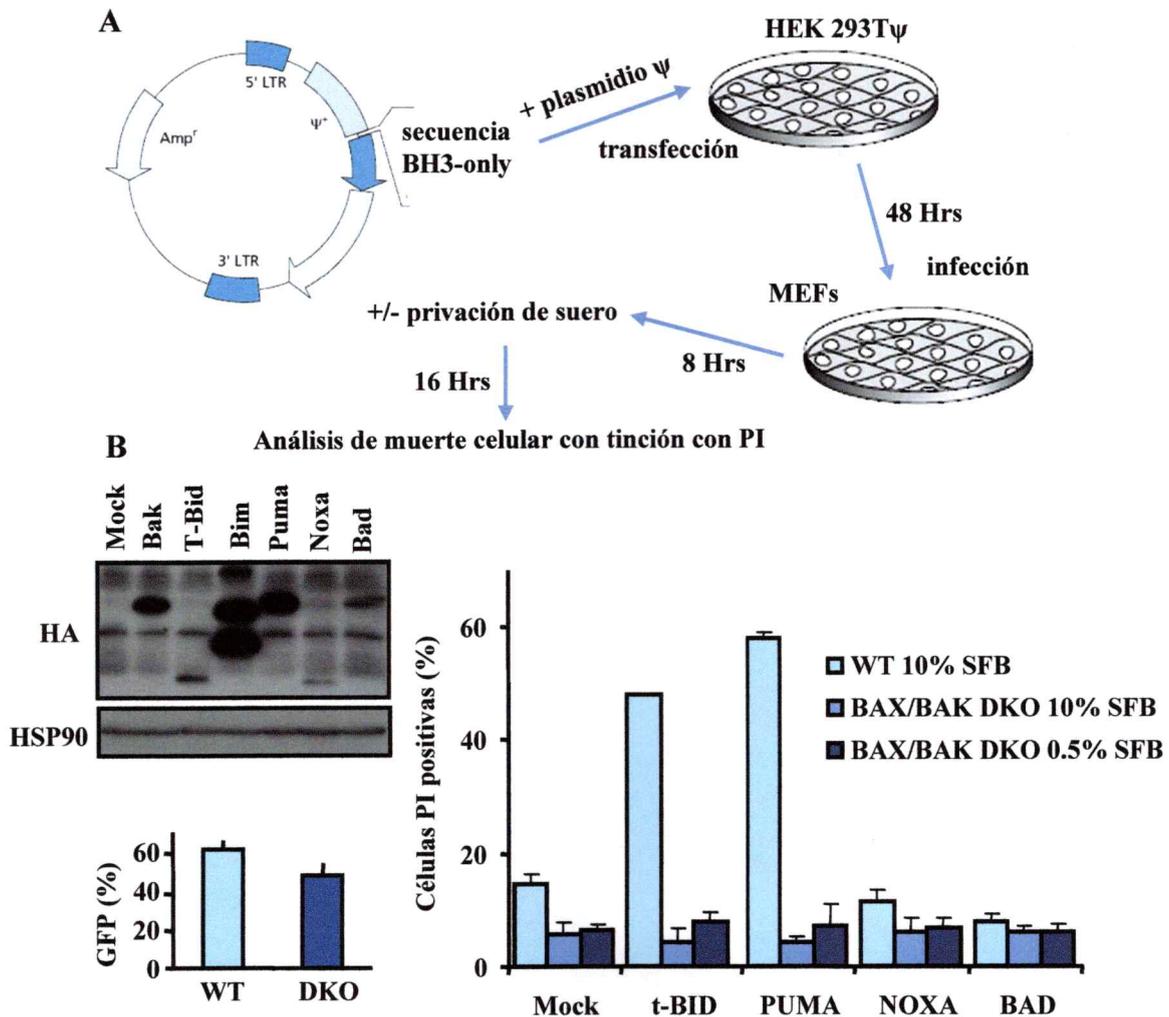


**Figura 9: Las células BIM/PUMA DKO son resistentes a la muerte celular inducida por estrés de RE, pero desarrollan apoptosis en condiciones de privación de suero.** (A) Células WT o deficientes en diferentes proteínas BH3-only, incluyendo células nulas para BIM (BIM KO), nulas para PUMA (PUMA KO) y doble nulas para BIM y PUMA (BIM/PUMA DKO) fueron incubadas con 0,5 µg/mL de tunicamicina por 24 horas. Luego la viabilidad celular fue determinada mediante la tinción con PI y análisis por citometría de flujo. El gráfico representa dos determinaciones independientes. (B) Las células WT y BIM/PUMA DKO fueron privadas de suero por 2 horas, y luego tratadas con las concentraciones indicadas de tunicamicina por 24 horas. Luego, la viabilidad celular fue determinada mediante la tinción con PI y análisis por citometría de flujo (5000 eventos por muestra). El gráfico representa los promedios y desviaciones estándar de uno de tres experimentos independientes.

Como se evidenció en estos ensayos de muerte celular en un modelo de pérdida de función, las proteínas BH3-only activadoras BIM y PUMA son fuertes inductores de la apoptosis mediada por estrés de RE, recapitulando el fenotipo de células BAX/BAK DKO. Por lo tanto, decidimos investigar su posible rol en la muerte celular independiente de BAX y BAK en condiciones de bajo suero y estrés de RE. Para esto, realizamos ensayos de viabilidad con tinción con PI en condiciones de privación de suero y exposición a tunicamicina utilizando ahora células WT y DKO BIM/PUMA. Al pre-incubar las células BIM/PUMA DKO con medio de cultivo con 0,5% de suero y luego inducir estrés de RE, la resistencia a la muerte celular fue revertida (Figura 9B). Por lo tanto, las células BIM/PUMA DKO simulaban el comportamiento de las células BAX/BAK DKO en nuestras condiciones experimentales, sugiriendo que la apoptosis gatillada por la combinación entre privación de suero y estrés de RE es también independiente de proteínas BH3-only como BIM y PUMA.

Para complementar estos experimentos, realizamos estudios de ganancia de función mediante la sobre-expresión de un panel de proteínas BH3-only. Para esto fue utilizado un sistema de expresión retroviral basado en el plasmidio de expresión pMSCV para entregar el cDNA de las proteínas BH3-only t-BID, PUMA, NOXA y BAD en células WT y BAX/BAK DKO (Figura 10A). Como ha sido descrito anteriormente (Kim et al., 2006), sólo la sobre-expresión de proteínas BH3-only activadoras PUMA y t-BID indujeron muerte celular en MEFs, y esta muerte fue dependiente de BAX y BAK (Figura 10B). Asimismo, no fue posible observar un aumento en la muerte celular después de expresar las proteínas BH3-only en células BAX/BAK DKO en medio de cultivo con 0,5% de suero, sugiriendo que la dependencia de las proteínas BH3-only en

la expresión de BAX y BAK se mantiene en nuestro sistema experimental. Todos estos datos en conjunto sugirieron que las proteínas BH3-only no están involucradas en la regulación de la apoptosis independiente de BAX y BAK, gatillada por la combinación entre estrés de RE y privación de suero. Estos resultados concuerdan con el hecho de que las proteínas BH3-only estarían normalmente regulando la vía intrínseca de apoptosis río arriba de BAX y BAK (Kim et al., 2006).

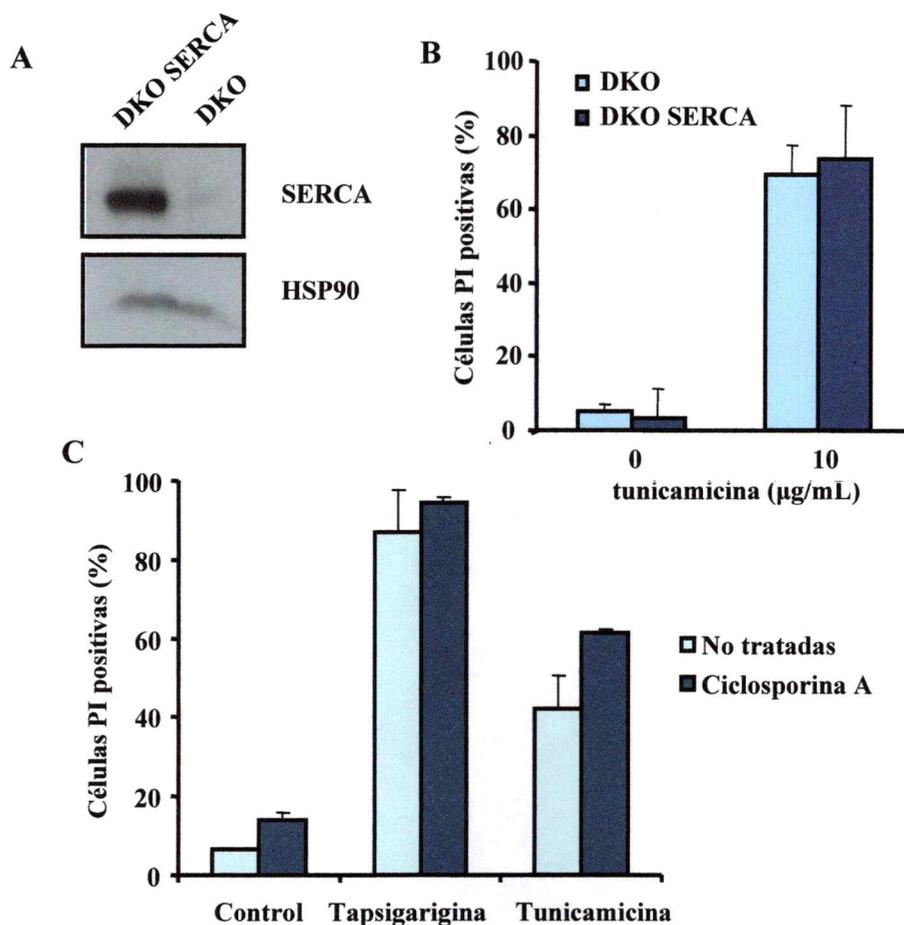


**Figura 10: La sobre-expresión de proteínas pro-apoptóticas BH3-only no induce apoptosis en condiciones de privación de suero en las células BAX/BAK DKO.** (A) Esquema de transfección e infección viral con vectores retrovirales pMSCV que expresan proteínas BH3-only activadoras y sensibilizadoras (t-BID-HA, PUMA-HA, NOXA-HA, BAD-HA o un control de vector vacío vacío Mock). Células HEK293T  $\psi$  fueron transfectadas con el plasmidio empaquetador  $\psi$  y el vector pMSCV-BH3-only o con el control pMSCV-Mock. Luego de 48 horas, el medio de cultivo que contenía los retrovirus fue colectado, filtrado y utilizado para infectar las células WT y BAX/BAK DKO. (B) Las células WT y BAX/BAK DKO fueron infectadas con retrovirus que expresan proteínas BH3-only. Tras 8 horas de infección estas células fueron incubadas con 0,5% ó 10% de suero por 16 horas. Luego, la viabilidad celular fue cuantificada mediante la tinción con PI y el análisis por citometría de flujo (5000 eventos por muestra). El gráfico representa los promedios y desviaciones estandar de un experimento representativo de tres experimentos en total. Además, la eficiencia de transfección fue medida a través de un ensayo de Western Blot con anti-HA a partir de extractos totales de proteínas provenientes de las células HEK donde se generaron los virus. Por otro lado, la eficiencia de infección de las células WT y DKO fue seguida a través de FACS, cuantificando las células GFP positivas.

#### **4.4 La muerte celular en las células BAX/BAK DKO bajo condiciones de privación de suero y estrés de RE es independiente de ciclofilina D.**

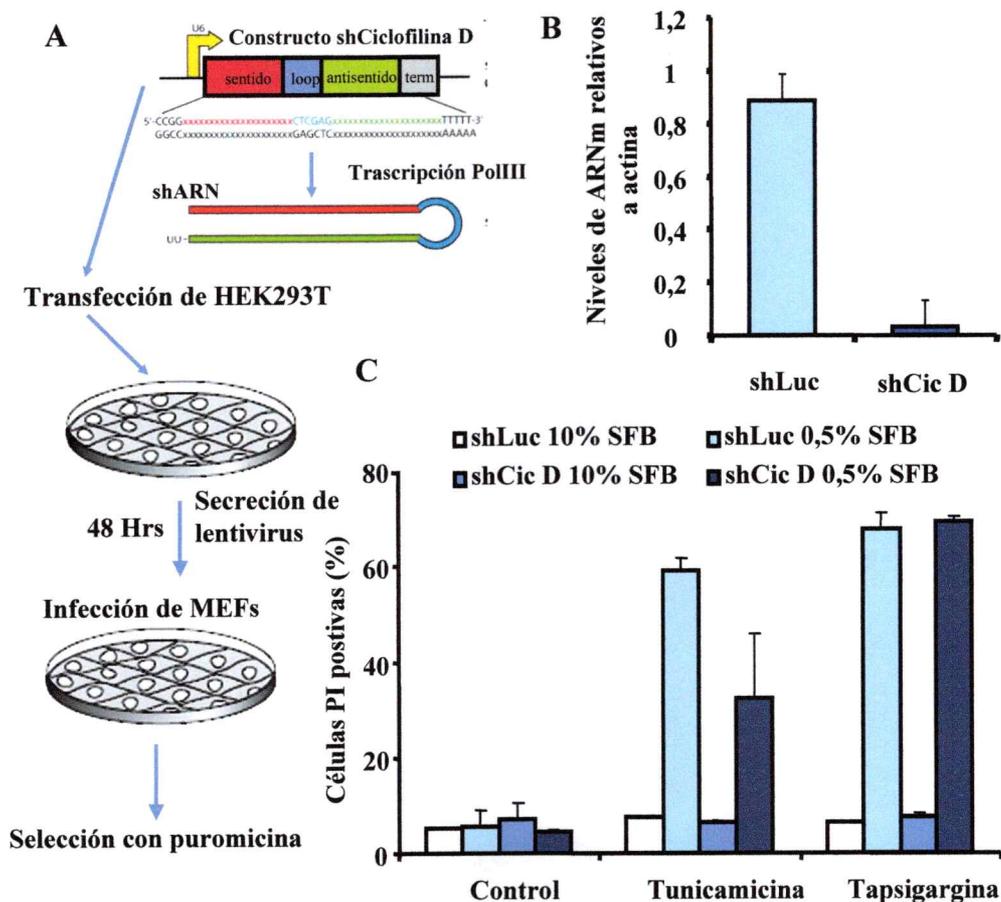
Debido a que la liberación de citocromo c fue observada en células BAX/BAK DKO bajo condiciones de privación de suero y estrés de RE, la posible participación de el PTP fue evaluada. Para definir el rol de este poro en la muerte celular observada en las células BAX/BAK DKO, primero definimos el posible rol del calcio en el proceso. Como ya hemos mencionado, las células BAX/BAK DKO poseen bajos niveles de calcio en el lumen del RE, por lo que al ser estresadas, no liberan grandes cantidades de calcio hacia la mitocondria y no activan el PTP (Scorrano et al., 2003). Este defecto en los niveles de calcio puede ser revertido al sobre-expresar ectópicamente la bomba de calcio reticular SERCA, lo que nos permite manipular los niveles de calcio liberado del RE (Scorrano et al., 2003). Sin embargo, al realizar ensayos de viabilidad en condiciones de bajo suero y estrés de RE en células BAX/BAK DKO-SERCA (Figura 11A), no fueron observados cambios en los niveles de muerte celular en relación a células BAX/BAK DKO (Figura 11B).

El PTP es farmacológicamente inhibido por la ciclosporina A, un compuesto que actúa sobre ciclofilina D (Tsujiyama and Shimizu, 2007). Para complementar nuestros estudios, las células BAX/BAK DKO fueron preincubadas con ciclosporina A y luego estimuladas con privación de suero y estrés de RE. Sorprendentemente, no fue posible observar cambios significativos en la muerte de estas células al inhibir el PTP (Figura 11C). Ambos experimentos sugirieron que el PTP no estaría involucrado en la muerte observada en las células BAX/BAK DKO en nuestro sistema experimental.



**Figura 11: La sobre-expresión de SERCA o la inhibición de ciclosporina D no influyen en la muerte celular producida por privación de suero y estrés de RE en las células BAX/BAK DKO.** (A) Extractos de proteínas totales de células BAX/BAK DKO (DKO) controles o que sobre-expresan SERCA de conejo fueron analizados mediante Western blot. El anticuerpo utilizado no reconoce la isoforma de ratón. Como control los niveles de HSP90 fueron determinados en los mismos extractos. (B) Las células BAX/BAK DKO que sobre-expresan SERCA (DKO SERCA) o las células controles (DKO) fueron pre-condicionadas con privación de suero por 2 horas y luego incubadas con tunicamicina (10 µg/mL). Luego de 24 horas, la viabilidad celular fue medida mediante la incorporación de PI y análisis mediante citometría de flujo (5000 eventos por muestra). Los gráficos representan el promedio y la desviación estándar de dos determinaciones. (C) Las células BAX/BAK DKO previamente incubadas con medio con 0,5% de SFB por 2 horas, fueron incubadas con 1 µM de ciclosporina A y luego tratadas con 10 µg/ml de tunicamicina o 10 µM de tapsigargina. Luego de 24 horas, la viabilidad celular fue determinada mediante tinción con PI y análisis por citometría de flujo (5000 eventos por muestra). El gráfico representa los promedios y desviaciones estándar de dos experimentos independientes.

Para confirmar estos resultados, decidimos realizar un silenciamiento del gen de ciclofilina D en las células BAX/BAK DKO para así generar células triple-deficientes y luego estudiar la participación del PTP en el proceso de muerte celular. Para esto, fueron utilizados vectores de expresión lentiviral de ARN de interferencia (shRNA por “short hairpin RNA”) para generar líneas celulares estables con niveles disminuídos de ciclofilina D (Figura 12A). La generación de una línea celular deficiente para ciclofilina D fue confirmada a través de un PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para el gen de ciclofilina D, obteniéndose una disminución drástica de la expresión del gen (Figura 12B). Luego, ensayos de viabilidad con PI fueron realizados utilizando esta línea celular y un control donde un shARN no relacionado fue utilizado (contra el gen *luciferasa*). En estos ensayos, el silenciamiento de ciclofilina D no protegió frente a la muerte celular inducida por el tratamiento con tunicamicina o taspigargina y la privación de suero (Figura 12C). Tomando estos datos en conjunto, nuestros resultados indican que la combinación de estrés de RE y la privación de suero en el medio de cultivo gatillan una vía alternativa de apoptosis intrínseca, la que es independiente de las vías clásicas de regulación de la apoptosis mediadas por BAX/BAK y el PTP.



**Figura 12: La apoptosis observada en células deficientes de BAX y BAK frente a estrés de RE y privación de suero es independiente de la expresión de ciclofilina D.** (A) Esquema de producción e infección de células MEFs con lentivirus que preparados con el vector pLKO.1 que expresa la secuencia de un shARN diseñado contra el ARNm de *ciclofilina D*. Como control fue utilizado un shARN contra el ARNm de *luciferasa*. Estos vectores fueron co-trasfectados junto con los vectores de empaquetamiento y proteína de cubierta ( $\Delta 8.9$  y VSV-G respectivamente) en células HEK293T para producir los lentivirus. Posteriormente, las células BAX/BAK DKO fueron infectadas con estos lentivirus y seleccionadas con puromicina para producir el silenciamiento estable de *ciclofilina D*. (B) Los niveles de silenciamiento del ARNm de *ciclofilina D* fueron determinados mediante un PCR en tiempo real a partir de ADNc producido con el ARNm total extraído de células BAX/BAK DKO transducidos con el vector control (shLuc) o el lentivirus que expresa el shARN contra el ARNm de *ciclofilina D* (shCic D). Los valores de ARNm fueron normalizados con los obtenidos al determinar los niveles de ARNm de *actina* en cada muestra. (C) Las células BAX/BAK DKO shCic D y shLuc fueron sometidas a condiciones de privación de suero por 2 horas y luego tratadas con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina o 10  $\mu\text{M}$  de tapsigargina. Luego de 24 horas, la incorporación de PI fue medida mediante citometría de flujo (5000 eventos por muestra). El gráfico representa los promedios y desviaciones estándar de un experimento representativo de tres determinaciones independientes.

## 5. Discusión.

En este trabajo hemos descrito condiciones experimentales donde dos estímulos clásicos de apoptosis intrínseca en conjunto activan la maquinaria apoptótica en la ausencia de BAX, BAK y ciclofilina D. Es importante resaltar que en la literatura las proteínas multidominio BAX y BAK son consideradas como componentes esenciales de la vía apoptótica intrínseca activada, por ejemplo, por estrés de RE (Wei et al., 2001). Diferentes estímulos intrínsecos de muerte convergen en la activación conformacional de estas proteínas, llevando a la apoptosis. Cabe destacar que los ratones doble deficientes para BAX y BAK presentan una letalidad a nivel embrionario del 90% debido a fallas en la apoptosis durante el desarrollo, sugiriendo un rol esencial en la muerte celular. Analizando estos resultados desde otra perspectiva, existe un 10% de ratones doble deficientes en BAX y BAK que llegan a la etapa adulta, indicando que un desarrollo adecuado puede ocurrir en la ausencia de BAX y BAK (Lindsten et al., 2000). En este contexto, nuestros resultados sugieren que estímulos intrínsecos de muerte celular pueden iniciar la apoptosis en la ausencia de BAX, BAK y ciclofilina D, sugiriendo que existe otro mecanismo adicional de liberación de citocromo c, etapa esencial en la activación de la apoptosis que se ha llamado como el “punto de no retorno”.

### **5.1 Activación de apoptosis intrínseca en la ausencia de BAX y BAK.**

La muerte celular observada en las células BAX/BAK DKO en condiciones de privación de suero y estrés de RE ocurre por mecanismos de apoptosis ya que fue posible observar la aparición de diferentes marcadores clásicos de este proceso, tanto morfológicos como bioquímicos (Figuras 4 y 5). Dentro de estos marcadores, la liberación de citocromo c y la caída del potencial mitocondrial sugieren la activación de la vía intrínseca clásica o mitocondrial, con la consecuente activación de caspasas río abajo. La participación de las caspasas en esta muerte celular fue estudiada en ensayos con células BAX/BAK DKO donde la apoptosis fue parcialmente inhibida mediante el pre-tratamiento con inhibidores de caspasas generales (Figura 5A). Para investigar a fondo la señalización río abajo de la liberación de citocromo c, en nuestro laboratorio estamos actualmente produciendo células WT y BAX/BAK DKO con deficiencia en *caspara-9* y *apaf-1*, ambas proteínas indispensables para la formación del apoptosoma y la consiguiente activación de las caspasas efectoras (Kuida et al., 1998; Yoshida et al., 1998). En ensayos de viabilidad celular, predecimos que estas líneas deberían dar luces sobre la participación del apoptosoma en la muerte observada bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero.

### **5.2 Mecanismo de liberación de citocromo c independiente de BAX/BAK y ciclofilina D.**

La vía clásica de liberación de citocromo c por estímulos apoptóticos intrínsecos requiere la participación de BAX y/o BAK (Wei et al., 2001). Nuestros resultados

sugieren la existencia de otro mecanismo independiente de BAX/BAK por el cual el citocromo c estaría siendo liberado al citoplasma y produciendo apoptosis ya que, bajo nuestras condiciones experimentales, logramos observar una disminución del potencial mitocondrial (Figura 6A), revelando la posible participación de este organelo en la muerte celular observada.

Se ha descrito que el PTP, un poro mitocondrial dependiente de calcio, puede mediar la liberación de citocromo c y la muerte celular dependiente de caspasas (Tsujimoto and Shimizu, 2007). Al estudiar la participación del PTP en la apoptosis utilizando líneas triple deficientes en BAX, BAK y ciclofilina D, logramos observar en ensayos de muerte celular que el PTP no participa en este proceso, dado que el silenciamiento de ciclofilina D no fue suficiente para inhibir la muerte celular observada en nuestro modelo experimental (Figura 12C).

El tercer miembro del subgrupo de proteínas pro-apoptótica de multidominio, BOK (del inglés BCL-2 related ovarian killer), es otro posible candidato que podría constituir el poro por el cual podría liberarse el citocromo c. Este miembro está pobremente caracterizado y al parecer su expresión se restringe a órganos reproductores. La sobre-expresión de esta proteína, homóloga de BAX y BAK, puede inducir apoptosis en diferentes tipos celulares (Rodriguez et al., 2006). Sin embargo, al analizar los niveles de expresión de *bok* mediante RT-PCR cuantitativo en células MEFs WT y BAX/BAK DKO no fue posible observar una expresión significativa del ARNm de *bok* en MEFs en comparación con tejidos con una alta expresión tales como el ovario (datos no mostrados). La expresión del ARNm de *bok* tampoco fue inducida bajo condiciones de estrés de RE y privación de suero. Estos resultados descartan indirectamente la posible

participación de BOK en la liberación de citocromo c en nuestro modelo de estudio. Sin embargo, si la apoptosis observada en nuestro sistema experimental fuera dependiente de BOK, sería predecible que estas células responderían a la sobre-expresión de BH3-only activadores, lo cual no fue observado.

Otro posible candidato sugerido en la literatura para formar el tercer poro mitocondrial son las ceramidas (Ow et al., 2008). Ha sido descrito que enzimas necesarias para la síntesis de estos lípidos se encuentran presentes en la mitocondria. Adicionalmente, se ha observado una alta concentración mitocondrial de estos lípidos en etapas tempranas de apoptosis. Por otra parte, las ceramidas tienen la capacidad de formar poros en membranas lipídicas artificiales por los cuales pueden pasar moléculas pequeñas (Siskind, 2005). Además, estudios con mitocondrias purificadas demostraron que la adición de ceramidas promueve la liberación de citocromo c. Una manera de estudiar el rol de las ceramidas en nuestro modelo sería mediante el uso de inhibidores de las esfingomielinasas o, alternativamente, silenciando los genes necesarios para la síntesis de las ceramidas, ésto con el objetivo de analizar su efecto en la liberación de citocromo c o en la viabilidad celular.

### **5.3 Regulación de la vía apoptótica.**

Las proteínas de la familia BCL-2 son descritas en la literatura como las reguladoras clásicas de la apoptosis (Youle and Strasser, 2008). La apoptosis es un proceso altamente controlado por sus diferentes componentes, tanto pro- como anti-apoptóticos. En este trabajo, se pudo descartar la participación de las proteínas pro-

apoptóticas BH3-only en la apoptosis en condiciones de estrés de RE y privación de suero. La expresión de ARNm de BIM, PUMA y NOXA fue inducido por estrés de RE (Figura 8A y B) y la ausencia de BIM y PUMA confirió resistencia a la apoptosis por estrés de RE (Figura 9A). Por otro lado, la expresión de proteínas BH3-only activadoras inducen apoptosis a través de su expresión en células WT (Kim et al., 2006). En concordancia con la literatura, nuestro modelo de sobre-expresión de las proteínas BH3-only t-BID, PUMA, NOXA y BAD demostró que sólo las activadoras t-BID y PUMA lograron inducir apoptosis en células WT y no las proteínas BH3-only sensibilizadoras tales como como NOXA y BAD (Figura 10B). Sin embargo, en células BAX/BAK DKO expuestas a 0,5% de suero en el medio de cultivo no fue observada apoptosis, a pesar de la sobre-expresión de proteínas BH3-only (Figura 10B). Las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2, como BCL-2 y BCL-XL, también juegan un papel fundamental en la regulación negativa de la apoptosis intrínseca. Actualmente estamos realizando experimentos de sobre-expresión de estas proteínas en células DKO BAX/BAK con el objetivo de estudiar su rol en la apoptosis observada en condiciones de estrés de RE y privación de suero. El resultado que predecimos es que las células BAX/BAK DKO que sobre-expresen BCL-2 o BCL-XL entrarán en apoptosis en condiciones de estrés de RE y privación de suero, a diferencia de su contraparte WT en condiciones de estrés de RE, ya que deberían presentar una resistencia a este proceso dada por la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas y su efecto inhibitorio río arriba de BAX y BAK. Estos experimentos en conjunto ayudarán a definir en más detalle la existencia de una nueva vía de apoptosis intrínseca independiente de la familia BCL-2.

Otro poro descrito como causante de la liberación de citocromo c es el PTP. Este poro se activa cuando se genera una sobrecarga de calcio en la mitocondria. En un trabajo realizado por Scorrano y colaboradores, fue observado que las células BAX/BAK DKO poseen un bajo contenido de calcio en el RE y que esta deficiencia puede ser revertida mediante la expresión de la bomba de calcio SERCA en el RE (Scorrano et al., 2003). Las células BAX/BAK DKO-SERCA presentaron una recuperación en su susceptibilidad frente a la apoptosis dependiente de estímulos que producen liberación de calcio de compartimentos intracelulares tales como ceramidas,  $H_2O_2$  y ácido araquidónico, pero no por estímulos que generan estrés de RE. Sin embargo, experimentos realizados por el grupo de Tsujimoto demostraron un proceso de apoptosis dependiente de la liberación de citocromo c en células BAX/BAK DKO incubadas con una combinación de ácido araquidónico y un ionóforo de calcio, ambos estímulos dependientes de calcio. Esta apoptosis es dependiente de la activación de caspasas y de serina-proteasas, pero independiente de ciclofilina D y PTP (Mizuta et al., 2007). En nuestro trabajo, la expresión de SERCA en células BAX/BAK DKO (figura 11B) y la incubación con ciclosporina A (figura 11C) no lograron modular la muerte celular observada en condiciones de estrés de RE y privación de suero, dando indicios de que la liberación de calcio probablemente no estaría regulando la apoptosis observada.

#### **5.4 Especificidad del estímulo de muerte celular.**

Uno de los aspectos más interesantes de este trabajo fue encontrar que sólo estresores específicos de RE fueron capaces de provocar apoptosis en células BAX/BAK

DKO bajo condiciones de privación de suero (figura 7B). Esto sugiere que podría existir una señal específica proveniente del RE que gatilla la apoptosis mediada por la liberación de citocromo c en la mitocondria. Dentro de las señales de muerte que se inducen por estrés de RE que han sido descritas en la literatura se encuentra la activación de JNK (del inglés cJun-N kinase), una kinasa que está involucrada en apoptosis extrínseca inducida por ligando y que además puede ser activada por estrés de RE (Urano et al., 2000). En condiciones de estrés de RE, el sensor de estrés de RE IRE1- $\alpha$ , a través de su dominio citosólico une a TRAF2 (del inglés tumor necrosis factor receptor associated factor 2), una proteína adaptadora que activa a JNK. Por otro lado, ha sido descrito que GSK3 $\beta$  (del inglés glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) puede ser inducida por tapsigargina y su activación por desfosforilación genera la activación de caspasa-3 y la consiguiente apoptosis (Song et al., 2002). Tanto JNK como GSK3 $\beta$  fueron descartadas como participantes en la muerte observada en células BAX/BAK DKO en experimentos de viabilidad complementarios con Anexina-V-FITC realizados con inhibidores específicos de JNK y GSK3 $\beta$ . En estos ensayos no se observó ningún efecto de los inhibidores en la muerte producida en las células BAX/BAK DKO con estrés de RE y privación de suero (datos no mostrados).

Otra proteína que ha sido, no sin controversia (Obeng and Boise, 2005), involucrada en muerte mediada por estrés de RE es caspasa-12 (Nakagawa et al., 2000; Yoneda et al., 2001). En células de ratón, pro-caspasa-12 es procesada posiblemente por interacción con el complejo IRE1- $\alpha$  y TRAF2, produciendo apoptosis luego de ser inducido estrés de RE. Para estudiar el papel del procesamiento de la pro-caspasa-12 en nuestro modelo, fueron realizados ensayos de inmuno blot en los cuales no se observó

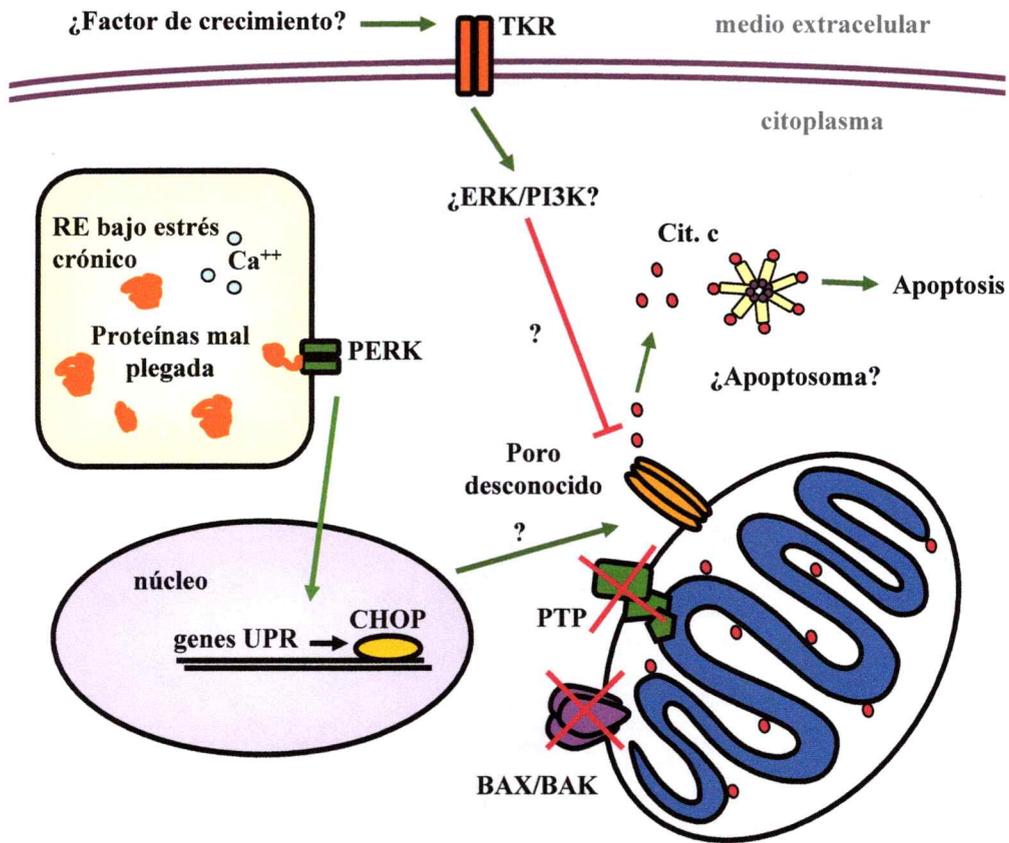
cambio en los niveles de procesamiento de la pro-caspasa-12 en células BAX/BAK DKO con estrés de RE, incluso en condiciones adicionales de privación de suero (datos no mostrados).

Por último, otra rama de la UPR que ha sido ligada con la inducción de la apoptosis es la vía del sensor de estrés de RE, PERK. Este sensor, al ser activado por la acumulación de proteínas mal plegadas, activa a ATF4, un factor de transcripción que induce el aumento de genes que producen una disminución de la acumulación de proteínas en el RE. Sin embargo, también activa la transcripción de CHOP, un factor de transcripción que induce apoptosis (Lin et al., 2007; Marciniak et al., 2004; McCullough et al., 2001). Para evaluar el rol de esta vía de la UPR como inductor de la apoptosis bajo nuestras condiciones experimentales, estamos actualmente generando líneas de células BAX/BAK DKO con los tres componentes de esta vía silenciados, PERK, ATF4 y CHOP. Al realizar los ensayos de viabilidad en estas líneas, podremos investigar el rol específico de la vía PERK en la muerte observada en nuestro modelo.

### **5.5 Regulación río arriba del estímulo apoptótico.**

Basados en el hecho de que la apoptosis observada en este estudio es dependiente específicamente de estrés de RE en condiciones de privación de suero, nosotros especulamos que una vía de señalización dependiente de factores de crecimiento podría estar normalmente inhibiendo una vía de apoptosis alternativa, independiente de BAX/BAK y el PTP. En este contexto, surgen por lo menos dos candidatos interesantes: la cascada de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, del inglés extracelular

signal-regulated kinase cascade) y la vía de la quinasa AKT. La vía de AKT/PI3K (siglas del inglés Phosphoinositide 3-kinases) ha sido implicada en la liberación de citocromo c en presencia y ausencia de BAX y BAK a través de la activación de hexoquinasas (Majewski et al., 2004). Sin embargo, en experimentos de nuestro laboratorio, realizados en células BAX/BAK DKO con 10% de suero y en presencia de tunicamicina y tres inhibidores independientes de la vía PI3K, no pudimos observar la inducción de muerte celular similar a la observada bajo una combinación de estrés de RE y privación de suero (datos no mostrados). Además, como se mencionó anteriormente, al incubar con inhibidores de JNK y GSK3 $\beta$ , las células BAX/BAK DKO no presentaron protección a la muerte celular (datos no mostrados). Estas observaciones descartarían indirectamente la participación de esta vía en la regulación de la apoptosis observada al incubar células BAX/BAK DKO con estresores de RE en condiciones de privación de suero. Sin embargo, resta pesquisar la participación de la vía ERK en la muerte observada en células BAX/BAK DKO bajo estrés de RE en condiciones de privación de suero.



**Figura 13. Modelo especulativo para explicar la apoptosis mediada por estrés de RE bajo condiciones de privación de suero independiente de BAX/BAK y de PTP.** Cuando el RE se encuentra bajo estrés crónico, se activan vías que llevan a apoptosis, como por ejemplo la vía de la UPR mediadas por el sensor de estrés de RE PERK y sus factores de transcripción río abajo ATF4 y CHOP. Esto lleva a un desbalance entre los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas en la membrana externa de la mitocondria, activando a BAX y BAK, con la consecuente salida de citocromo c hacia el citoplasma. Alternativamente, la recarga de calcio de la mitocondria abre el PTP, promoviendo la translocación de citocromo c hacia el citoplasma. Factores de crecimiento que se encuentran en el suero podrían estar inhibiendo un poro alternativo que promueve la liberación de citocromo c bajo condiciones de estrés de retículo que es independiente de BAX/BAK y de ciclofilina D (PTP). Esta inhibición podría estar mediada por vías de transducción de señales a través de ERK/PI3K. Este poro podría estar formado por ceramidas y estar sujeto a regulación. El citocromo c liberado, probablemente formaría parte del apoptosoma, lo que lleva a apoptosis por la vía intrínseca, a través de la activación del apoptosoma y de caspasas efectoras.

## 6. Conclusiones.

En este trabajo se presenta evidencia de la existencia de una vía alternativa de apoptosis, independiente de BAX y BAK, proteínas esenciales para la activación de la apoptosis intrínseca bajo diferentes estímulos. Además, fue posible descartar la participación de ciclofilina D y del poro dependiente de calcio, PTP, en esta muerte celular. Interesantemente, la apoptosis observada ocurre bajo condiciones específicas de estrés de RE y privación de suero y no otros tipos de estrés como son el daño al DNA, daño a microtubulos o estrés oxidativo. Esta combinación de estresores gatillaría la liberación de citocromo c con la consiguiente muerte celular dependiente de caspasas. Es decir, la muerte celular observada en estas células BAX/BAK DKO estaría inhibida en condiciones normales de cultivo celular (alto suero) y sería activada o desinhibida en condiciones de privación de suero. Aun queda por definir los mecanismo de regulación implicados en esta muerte celular. Sin embargo, hemos podido descartar la participación en la regulación de esta apoptosis a las proteínas BH3-only y la participación del PTP en el proceso.

El conocimiento de la existencia de una apoptosis independiente de BAX/BAK y ciclofilina D podría ser de vital importancia al momento de diseñar estrategias con el fin de alterar la regulación mediada por la familia BCL-2, en el contexto de alguna enfermedad. Eso debido a que, dependiendo del contexto celular, por ejemplo en presencia o ausencia de factores de crecimiento, la regulación de la apoptosis tal cual la conocemos podría variar drásticamente.

## 7. Referencias.

- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., Molkenin, J.D., 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658-662.
- Bao, Q., Shi, Y., 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell death and differentiation* 14, 56-65.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., Roderick, H.L., 2002. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 12, R563-565.
- Cheng, E.H., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., Korsmeyer, S.J., 2003. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 301, 513-517.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., Korsmeyer, S.J., 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* 8, 705-711.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Futami, T., Miyagishi, M., Taira, K., 2005. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *The Journal of biological chemistry* 280, 826-831.
- Green, D.R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Grimm, S., Brdiczka, D., 2007. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855.
- Hetz, C., Glimcher, L., 2008. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends in cell biology* 18, 38-44.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., Castilla, J., Soto, C., 2005a. The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci* 25, 2793-2802.
- Hetz, C., Vitte, P.A., Bombrun, A., Rostovtseva, T.K., Montessuit, S., Hiver, A., Schwarz, M.K., Church, D.J., Korsmeyer, S.J., Martinou, J.C., Antonsson, B., 2005b. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in

- a model of global brain ischemia. *The Journal of biological chemistry* 280, 42960-42970.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Kim, H., Raffiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., Cheng, E.H., 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature cell biology* 8, 1348-1358.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16, 3-11.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A., 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.
- Kutuk, O., Letai, A., 2008. Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications. *Current molecular medicine* 8, 102-118.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J., 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell* 2, 183-192.
- Li, J., Lee, B., Lee, A.S., 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry* 281, 7260-7270.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., Williams, R.S., 2000. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101, 389-399.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., Walter, P., 2007. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y)* 318, 944-949.

- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular cell* 6, 1389-1399.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., Hay, N., 2004. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular cell* 16, 819-830.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., Ron, D., 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* 18, 3066-3077.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 21, 1249-1259.
- Michalak, E.M., Villunger, A., Adams, J.M., Strasser, A., 2008. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell death and differentiation* 15, 1019-1029.
- Mizuta, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Nakagawa, T., Tsujimoto, Y., 2007. A Bax/Bak-independent mechanism of cytochrome c release. *The Journal of biological chemistry* 282, 16623-16630.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y., 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Obeng, E.A., Boise, L.H., 2005. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 29578-29587.
- Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J., 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature immunology* 4, 410-415.

- Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W., 2008. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature reviews* 9, 532-542.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A., 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular cell* 3, 287-296.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., Strasser, A., 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.
- Reimertz, C., Kogel, D., Rami, A., Chittenden, T., Prehn, J.H., 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only-protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *The Journal of cell biology* 162, 587-597.
- Rimessi, A., Giorgi, C., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008. The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica et biophysica acta* 1777, 808-816.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Pozzan, T., 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science (New York, N.Y)* 280, 1763-1766.
- Rodriguez, J.M., Glozak, M.A., Ma, Y., Cress, W.D., 2006. Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 22729-22735.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews* 8, 519-529.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 300, 135-139.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., Korsmeyer, S.J., 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12005-12010.
- Siskind, L.J., 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37, 143-153.

- Song, L., De Sarno, P., Jope, R.S., 2002. Central role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 44701-44708.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y)* 281, 1312-1316.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M., 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, N.Y)* 228, 1440-1443.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12, 835-840.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y)* 287, 664-666.
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M., 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 15, 2922-2933.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y)* 292, 727-730.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., Tohyama, M., 2001. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry* 276, 13935-13940.
- Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., Mak, T.W., 1998. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739-750.
- Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews* 9, 47-59.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., Thompson, C.B., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology* 162, 59-69.