

Laura Vela Poves

# Visualización de las interacciones entre proteínas de la familia BCL-2 mediante BIFC en células vivas

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Marzo Rubio, María Isabel  
Naval Iraberri, Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

VISUALIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE  
PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2 MEDIANTE  
BIFC EN CÉLULAS VIVAS

Autor

Laura Vela Poves

Director/es

Marzo Rubio, María Isabel  
Naval Iraberri, Javier

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE CIENCIAS



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**  
**TESIS DOCTORAL**

**VISUALIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES  
ENTRE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2  
MEDIANTE BiFC EN CÉLULAS VIVAS**

Laura Vela Poves

Licenciada en Bioquímica

Para optar al grado de Doctor en Ciencias

Noviembre 2012



Dña. ISABEL MARZO RUBIO, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza y D. JAVIER NAVAL IRABERRI, Catedrático de Biología Celular, adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

#### CERTIFICAN

que la memoria de la Tesis Doctoral titulada “VISUALIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2 MEDIANTE BIFC EN CÉLULAS VIVAS”, presentada por Dña. Laura Vela Poves, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de esta Universidad bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones requeridas para que su autora pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, 13 de noviembre de 2012

Isabel Marzo Rubio

Javier Naval Iraberri



Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (BES-2008-004081) asociada al proyecto de investigación SAF2007-60748, del Ministerio de Ciencia e Innovación.



# ÍNDICE

---



<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 PROCESOS DE MUERTE CELULAR .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA APOPTOSIS.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 La vía extrínseca o de receptores mortales. ....	13
2.2.2 Caspasas. ....	15
2.2.2.1 Inhibidores de caspasas. ....	18
<b>2.3 VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL DE LA APOPTOSIS.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Papel de la mitocondria y sus cambios estructurales durante la apoptosis.....	19
2.3.2 Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). ....	21
2.3.3 Salida de factores apoptogénicos y fase final de la apoptosis. ....	23
<b>2.4 LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2.....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2. ....	35
2.4.2 Dimerización y oligomerización de Bak/Bax. ....	41
2.4.3 Las proteínas de la familia Bcl-2 como dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.....	45
<b>2.5 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS.....</b>	<b>47</b>
2.5.1 Métodos bioquímicos para estudiar interacciones entre proteínas. ...	48
2.5.1.1 Coinmunoprecipitación.....	48
2.5.1.2 Cristalografía de Rayos X. ....	50
2.5.1.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	50
2.5.1.4 Resonancia de plasma superficial. ....	50
2.5.1.5 “Arrays” de proteínas. ....	51
2.5.1.6 Doble híbrido en levadura. ....	51
2.5.2 Métodos basados en fluorescencia para la detección de interacciones entre proteínas. ....	52
2.5.2.1 Técnicas basadas en la Transferencia de Energía de Resonancia.....	52
2.5.2.2 Métodos basados en la complementación de dos fragmentos de una proteína (PCA).....	53

2.5.2.3	BiFC (Complementación Bimolecular Fluorescente).....	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>67</b>
3.1.1	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	67
3.1.2	Contaje y determinación de la viabilidad celular. ....	67
3.1.3	Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.....	68
3.1.4	Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	69
<b>3.2</b>	<b>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....</b>	<b>69</b>
3.2.1	Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	69
3.2.2	Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana....	70
3.2.3	Extracción de DNA plasmídico.....	71
3.2.4	Electroforesis de DNA en gel de agarosa. ....	71
3.2.5	Purificación de fragmentos DNA.....	72
3.2.6	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	72
3.2.7	Vectores para los ensayos de BiFC.....	72
3.2.7.1	Diseño de oligonucleótidos.....	75
3.2.7.2	Mutagénesis dirigida para generar proteínas de fusión control.....	77
3.2.7.3	Construcción de un vector de Bcl-X <sub>L</sub> fusionado al extremo carboxilo del fragmento Venus-C155.....	81
3.2.7.4	Construcción de un vector de Bak fusionado al extremo carboxilo del fragmento Venus-C155.....	83
3.2.7.5	Generación de vectores para BiFC Multicolor.....	84
3.2.8	Vectores retrovirales para la sobreexpresión estable de proteínas. ..	85
3.2.8.1	Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de forma estable.....	86
3.2.8.2	Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas de fusión fluorescentes de forma estable.....	87
3.2.8.3	Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas de fusión de Bax.	88

3.2.9	Digestión de los insertos y linearización de los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 / pBABe. ....	89
3.2.10	Ligación de los insertos en los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 / pBABE.....	90
3.2.11	Análisis de colonias positivas.....	90
<b>3.3</b>	<b>TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....</b>	<b>91</b>
3.3.1	Transfección transitoria de los vectores pBiFC.....	91
3.3.2	Generación de sobrenadantes retrovirales para la transfección estable. 92	
3.3.3	Infección de la línea celular HeLa con retrovirus. ....	93
3.3.4	Dilución límite para obtención de líneas estables. ....	94
<b>3.4</b>	<b>CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).....</b>	<b>95</b>
3.4.1	Análisis de las interacciones entre proteínas por BiFC.....	95
3.4.2	Análisis de las interacciones entre proteínas por BiFC Multicolor.....	95
3.4.3	Determinación de potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y translocación de fosfatidilserina. ....	96
<b>3.5</b>	<b>LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA .....</b>	<b>97</b>
3.5.1	Inmunolocalización de proteínas intracelulares. ....	97
3.5.2	Visualización de los complejos formados por BiFC.....	99
<b>3.6</b>	<b>ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR POR TINCIÓN CON HOECHST 33342.....</b>	<b>99</b>
<b>3.7</b>	<b>MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA TIME-LAPSE.....</b>	<b>99</b>
<b>3.8</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>100</b>
3.8.1	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales. ....	100
3.8.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	101
3.8.3	Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. ....	101
3.8.4	Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia (Western Blotting) y detección de los inmunocomplejos.....	102

<b>3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....</b>	<b>103</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA TÉCNICA BIFC.....</b>	<b>107</b>
4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas de fusión.....	108
4.1.2 Verificación de la funcionalidad de las proteínas de fusión.....	113
4.1.3 Efecto de la generación de fusiones sobre la localización y función de las proteínas.....	115
4.1.3.1 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Mcl-1.....	116
4.1.3.2 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Bcl-X <sub>L</sub> .....	119
4.1.3.3 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Bax.....	120
<b>4.2 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS MCL-1 Y BCL-X<sub>L</sub> CON MIEMBROS PROAPOPTÓTICOS DE LA FAMILIA BCL-2.....</b>	<b>127</b>
4.2.1. Interacciones de la proteína antiapoptótica Mcl-1 con proteínas proapoptóticas “sólo-BH3” y con las proteínas multidominio Bak y Bax.....	128
4.2.2. Interacciones de la proteína antiapoptótica Bcl-X <sub>L</sub> con proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2.....	139
4.2.3. Discusión sobre el papel de Mcl-1 y Bcl-X <sub>L</sub> en la vía intrínseca de la apoptosis.....	153
<b>4.3 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS “SÓLO-BH3” BIM, PUMA Y NOXA COMO ACTIVADORAS DIRECTAS DE LAS PROTEÍNAS EFECTORAS BAX Y BAK.</b>	<b>156</b>
4.3.1 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” Bim con Bak y Bax.....	159
4.3.2 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” PUMA con Bak y Bax.....	166
4.3.3 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” Noxa con Bak y Bax.....	173
4.3.4 Interacciones de las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con la proteína de fusión VC-Bak.....	178
4.3.5 Comprobación de las interacciones entre proteínas “sólo-BH3” y Bak/Bax en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO.....	181
4.3.6 Implicación del dominio BH3 y de la hélice $\alpha$ 1 de Bak y Bax en su unión a proteínas “sólo-BH3”.....	183
4.3.7 Discusión sobre el papel de las proteínas “sólo-BH3” en la activación de Bak/Bax.....	189

---

<b>4.4</b>	<b>HOMO Y HETERODIMERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PROAPOPTÓICAS BAK Y BAX.....</b>	<b>191</b>
4.4.1	Comprobación de las homodimerizaciones de Bak y Bax en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO. ....	197
4.4.2	Participación del dominio BH3 y de la hélice $\alpha$ 1 de Bak y Bax en su dimerización. ....	198
4.4.3	Discusión sobre el mecanismo de dimerización de las proteínas Bak y Bax. 204	
<b>4.5</b>	<b>EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓICAS SOBRE LAS INTERACCIONES DETECTADAS POR BIFC.....</b>	<b>206</b>
<b>4.6</b>	<b>COMPETICIÓN ENTRE PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓICAS Y BAX/BAK POR UNIRSE A PROTEÍNAS “SÓLO-BH3”.....</b>	<b>214</b>
	<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>227</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>233</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>237</b>



## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

---



Uno de los principales mecanismos de muerte celular es la apoptosis, descrita en el año 1972 por Kerr y colaboradores (Kerr et al. 1972). Este proceso de muerte está encaminado a la eliminación de aquellas células que están dañadas, infectadas o resultan prescindibles para el organismo. La muerte por apoptosis presenta una característica morfológica peculiar y es el mantenimiento de la membrana plasmática intacta, de manera que no se libera el contenido celular al exterior. Los cuerpos apoptóticos generados en la etapa final son fagocitados (Savill et al. 2002) y de forma general este proceso cursa en ausencia de procesos inflamatorios (Voll et al. 1997). Apoptosis y cáncer se encuentran estrechamente relacionados. La desregulación de los mecanismos de muerte por apoptosis puede romper el equilibrio que existe entre proliferación y muerte celular. Así, una alteración que favorezca los procesos de proliferación frente a los de muerte favorecería el desarrollo del cáncer. Además, la evasión de la apoptosis es una de las seis características biológicas que se necesitan para que una célula se transforme en tumoral (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011).

La apoptosis se puede producir a través de dos vías de señalización. La vía extrínseca o de receptores mortales se desencadena por los denominados ligandos mortales, pertenecientes a la familia del TNF (Factor de Necrosis Tumoral) (Ashkenazi and Dixit 1998). La vía intrínseca o mitocondrial, sin embargo, es inducida por estrés celular como daño al DNA, infección viral... (Shibue and Taniguchi 2006; Youle and Strasser 2008). En esta ruta participan activamente las proteínas de la **familia Bcl-2** que, mediante interacciones entre ellas, regulan la permeabilización de las mitocondrias y la salida al citosol de proteínas apoptogénicas. Las proteínas de esta familia comparten al menos uno de los dominios de homología a Bcl-2 (BH). Se pueden diferenciar miembros con actividad antiapoptótica como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> o Mcl-1, y otros con actividad proapoptótica (Cory and Adams 2002). Dentro del segundo grupo se diferencian las proteínas proapoptóticas multidominio como Bak y Bax, efectores responsables de la permeabilización de las mitocondrias, y las proteínas "sólo-BH3" como Bim, PUMA, Noxa, Bid y otras que son inducidas por estímulos apoptóticos (Willis et al. 2003; Certo et al. 2006).

A pesar de los avances de los últimos años en cuanto al papel de las proteínas Bcl-2 en la ruta de apoptosis, existen cuestiones importantes sobre el mecanismo de acción que siguen sin resolverse. Se han propuesto dos mecanismos principales mediante los cuales las proteínas Bak y Bax se activan para llevar a cabo la

permeabilización de las mitocondrias. Por una parte el **modelo indirecto** de activación propone que Bak y Bax están neutralizados por proteínas antiapoptóticas hasta que son liberadas por proteínas “sólo-BH3” que se inducen con los estímulos apoptóticos (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Por el contrario, el **modelo directo** de activación sugiere que ciertas proteínas “sólo-BH3”, denominadas activadoras, son capaces de unirse directamente a Bak y Bax para activarlas, una vez son liberadas de las antiapoptóticas por las “sólo-BH3” sensibilizadoras (Letai et al. 2002; Fletcher and Huang 2008a).

Nuestro laboratorio tiene amplia experiencia en el estudio de las proteínas Bcl-2 especialmente en leucemias y mielomas. Trabajo previo del laboratorio ha demostrado que en condiciones normales la mayor parte de Mcl-1 se encuentra unida a Bim en células derivadas de leucemia y mieloma (Lopez-Royuela et al. 2010). Además, se ha comprobado que el silenciamiento de la proteína Bim aumenta la resistencia en modelos celulares que tienen los niveles de Mcl-1 reducidos. Estos resultados muestran que al disminuir Mcl-1 las células derivadas de leucemia y mielomas mueren debido a la liberación de Bim. En este caso los resultados permiten descartar el modelo indirecto, para estos modelos celulares y la proteína Mcl-1 en concreto. También se ha observado que en células Jurkat el tratamiento con doxorubicina induce la activación de Bak, a pesar de que las caspasas se encuentren inhibidas (Lopez-Royuela et al. 2010). La degradación de Mcl-1 por parte de caspasas es necesaria para la inducción de apoptosis por diferentes estímulos (Nijhawan et al. 2003; Opferman et al. 2003). Probablemente en esta línea celular la degradación de Mcl-1 por las caspasas sea un evento secundario que ocurre de manera tardía. Además, como describen algunos autores, las células de determinados tumores se vuelven “adictas” a proteínas antiapoptóticas y esto hace que estén “pre-marcadas” para morir (Certo et al. 2006; Brunelle and Letai 2009). En este caso, la mayor expresión de proteínas antiapoptóticas haría que más proteínas “sólo-BH3” activadoras estuvieran unidas a ésta. Al inducirse las proteínas “sólo-BH3” sensibilizadoras, las activadoras quedarían libres para activar la ruta apoptótica. De manera complementaria se ha determinado que el papel de las proteínas proapoptóticas depende tanto del estímulo que induce la apoptosis como del modelo celular estudiado. En células Jurkat se ha observado que Bim no es esencial para la inducción de muerte por doxorubicina, vincristina o bortezomib (Lopez-Royuela et al. 2010) aunque su silenciamiento induce un aumento compensatorio en los niveles de expresión de Noxa y PUMA. Estos datos sugerirían el papel de PUMA como activador

de Bak/Bax en ausencia de Bim. El silenciamiento de Noxa ofrece una reducción limitada de la toxicidad inducida por bortezomib en células Jurkat, indicando que esta proteína probablemente no se encuentra implicada en la inducción de la ruta apoptótica en este modelo celular (Galan-Malo 2010). Sin embargo, en células U937 Bim parece tener un papel esencial en la inducción de la apoptosis ya que su silenciamiento protege de la muerte inducida por doxorubicina (Galan-Malo 2010). En estos dos modelos celulares se ha encontrado que Mcl-1 se encuentra unido a Bim, a Noxa (Galan-Malo 2010; Lopez-Royuela et al. 2010) y también a Bak (Perez-Galan et al. 2006). La inducción de apoptosis por doxorubicina y bortezomib implicaría la participación de Noxa que se uniría a Mcl-1 y liberaría tanto a Bim, que podría activar a Bak, y también al propio Bak que estuviera neutralizado por Mcl-1 (Galan-Malo 2010).

La mayoría de trabajos publicados que abordan el estudio de interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 están basados en las técnicas de inmunoprecipitación, o en el empleo de mitocondrias aisladas o liposomas en sistemas libres de células. Además, en la mayor parte de éstos se usan péptidos derivados del dominio BH3 de estas proteínas, no las proteínas enteras. En células intactas no se ha demostrado la existencia de interacción directa entre proteínas “sólo-BH3” putativamente activadoras y Bak/Bax. Por ello el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido estudiar las posibles interacciones que ocurren entre miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en células intactas mediante la técnica de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC) (Kerppola 2006). Dentro de este objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1. Estudiar el papel de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> en la neutralización de proteínas “sólo-BH3” y de Bak/Bax.**
- 2. Analizar el posible papel de las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa como activadoras directas de Bak y Bax.**
- 3. Estudiar los mecanismos de dimerización de Bak y Bax.**
- 4. Determinar los posibles dominios implicados en las mencionadas asociaciones.**
- 5. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> en las interacciones detectadas por BiFC.**



# INTRODUCCIÓN

---



## 2.1 PROCESOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular programada y la apoptosis son procesos fisiológicos esenciales que ocurren en los organismos eucariotas superiores tanto durante el desarrollo como a lo largo de la vida adulta para mantener la homeostasis tisular. La apoptosis cumple la función de eliminar aquellas células que se encuentran dañadas, infectadas o cuya función ha dejado de ser necesaria para el organismo. En los tejidos existe un equilibrio entre muerte y proliferación celular, que en determinados casos se rompe y da lugar a diversas patologías. Las alteraciones, bien por exceso o por defecto, en la apoptosis se han relacionado con patologías graves como enfermedades autoinmunes (diabetes tipo I, artritis reumatoide o lupus eritematoso), neurodegenerativas (Parkinson o Alzheimer), SIDA y cáncer (Tan et al. 2009). Según describen Hanahan y Weinberg la evasión de la muerte celular programada es una de las seis alteraciones que se necesita para que una célula se malignice (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011).

Existen diferentes tipos de muerte celular que suelen definirse según las características morfológicas que presentan las células que los sufren. Sin embargo, sería necesario tener en cuenta los mecanismos bioquímicos involucrados en dichos tipos de muerte para poder establecer criterios universales que caractericen cada uno de estos procesos de muerte celular. Con este objetivo el NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) ha publicado una serie de recomendaciones para la denominación y formulación de nuevos tipos de muerte celular (Kroemer et al. 2005; Kroemer et al. 2009; Galluzzi et al. 2012). Este comité propone que una célula se deberá considerar muerta cuando cumpla al menos una de estas condiciones:

- la membrana plasmática ha perdido su integridad;
- la célula y su núcleo se han fragmentado generando los denominados cuerpos apoptóticos;
- los fragmentos celulares generados han sido absorbidos por otras células adyacentes.

Según este comité, existen tres tipos de muerte celular principales: **apoptosis**, **necrosis** y **autofagia**. Estos procesos están altamente regulados a nivel génico y las vías de señalización que se activan en ellos se encuentran, en muchos casos, estrechamente relacionadas.

- **Apoptosis:** el término fue introducido por Kerr y colaboradores (Kerr et al. 1972) para definir ciertos rasgos morfológicos que presentaban las células al morir. Entre ellos se destaca que las células se van redondeando a la vez que hay retraimiento de sus pseudópodos. Además se produce una disminución del volumen celular, condensación de la cromatina (picnosis) y finalmente fragmentación nuclear. Los orgánulos celulares no sufren modificaciones estructurales importantes y la membrana se mantiene intacta hasta las últimas etapas del proceso de muerte. Finalmente, se forman pequeños fragmentos de la célula (*blebbing*) rodeados de membrana plasmática que son fagocitados por células vecinas.

- **Necrosis:** Aunque tradicionalmente se consideraba que era un tipo de muerte no controlada, en los últimos años se están aportando datos que apoyan que este proceso estaría regulado (Golstein and Kroemer 2007). Morfológicamente, se caracteriza por un aumento del volumen celular y dilatación de los orgánulos así como ruptura de la membrana plasmática y dispersión del contenido celular en el espacio extracelular.

Hay estudios que sitúan el papel de la necrosis como ruta de “rescate” para la muerte cuando la vía de la apoptosis se encuentra comprometida o bien cuando se activan mecanismos independientes de caspasas. Sin embargo, también se ha descrito que la necrosis puede tener un papel fisiológico en procesos de desarrollo. Además una característica fundamental que diferencia a la necrosis de la apoptosis es que suele desencadenar inflamación y puede activar el sistema inmune innato (Edinger and Thompson 2004; Festjens et al. 2006; Duprez et al. 2009).

Recientemente se ha caracterizado una forma de necrosis programada a la que se ha denominado **necroptosis** (Wu et al. 2012). Los rasgos morfológicos que presentan las células en este tipo de muerte son los mismos que para la necrosis. No obstante, la necroptosis tiene una vía de señalización propia: es inducida por la estimulación de receptores mortales con agonistas como TRAIL, FasL o  $TNF\alpha$  y requiere interacción de las quinasas RIP1 y RIP3. Además, puede ser inhibida específicamente por necrostatinas (Holler et al. 2000). Se ha descrito que la necroptosis está implicada en la regulación del desarrollo del sistema inmune así como que pueda acelerar la muerte de células cancerosas o aumentar su sensibilidad a determinados tratamientos (Wu et al. 2012).

- **Autofagia:** Descrito en 1963 como un proceso de degradación de orgánulos celulares dañados o no esenciales mediado por lisosomas (de Duve 1963). Se

caracteriza por la aparición dentro de la célula de vacuolas de doble membrana, que rodean material citoplasmático de ésta. En la mayoría de casos este proceso es una respuesta de supervivencia que se activa en situaciones de estrés como privación de nutrientes, calor o estrés oxidativo (Levine and Klionsky 2004; Boya et al. 2005; Mizushima 2007). El defecto de autofagia se encuentra íntimamente involucrado en la etiología de enfermedades de carácter neurodegenerativo y metabólico, incluyendo el cáncer (Meijer and Codogno 2009). Sin embargo, en algunos casos la autofagia se ha visto que está implicada en procesos de muerte celular. Se propone que este tipo de muerte podría ser independiente de la apoptosis o necrosis de manera que la maquinaria autofágica podría estar activamente participando de la muerte de la célula (Shen and Codogno 2010). Además, en estos casos, se observa que la inhibición de la autofagia vía farmacológica y por técnicas genéticas lleva al rescate de la célula.

Otros mecanismos de muerte celular menos conocidos son:

- **Excitotoxicidad:** es un fenómeno por el cual neuronas deficientes mueren debido a un aumento del calcio citosólico cuando aminoácidos de excitación como el glutamato provocan la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  N-metil-D-Aspartato (NMDA) (Orrenius et al. 2003).
- **Degeneración Walleriana:** proceso catabólico por el cual parte de una neurona o axón degenera sin afectar al resto de la célula neuronal (Luo and O'Leary 2005).
- **Cornificación:** también llamado “queratinización”, es un tipo de muerte celular programada por el que los queratinocitos al morir se convierten en corneocitos formando una capa que aporta resistencia mecánica, elasticidad, repelencia al agua y estabilidad estructural a la piel (Lippens et al. 2005).
- **Anoikis:** descrito en el año 1994 como un tipo de muerte que se induce por la pérdida de adhesión de las células a otras células de su tejido o a la matriz extracelular. Se activan los mecanismos moleculares propios de la apoptosis (Gilmore 2005), dándose un aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bim (Reginato et al. 2003).
- **Catástrofe mitótica:** tipo de muerte celular que ocurre durante o después de una mitosis fallida. Se caracteriza por la micronucleación (ocasionada por cromosomas y/o fragmentos de cromosomas que no se han distribuido de forma equitativa entre las células hijas) y multinucleación (presencia de dos o más núcleos de tamaño heterogéneo debido a un fallo en la separación durante la citocinesis) (Roninson et al. 2001). Más recientemente, se ha propuesto que la catástrofe mitótica no sea un mecanismo “puramente” de muerte celular, si no más bien una vía con finalidad

oncosupresora que precede a una senescencia o muerte celular por apoptosis o necrosis (Vitale et al. 2011).

- **Senescencia:** Inicialmente fue descrita como una parada celular irreversible, de manera que después de un número determinado de divisiones las células pierden la capacidad de dividirse más (Hayflick and Moorhead 1961). Después de cada ciclo de división celular, los telómeros de los cromosomas se van acortando debido a la baja actividad de la enzima telomerasa en las células adultas. De esta manera, cuando los telómeros se acortan hasta un determinado nivel, se activa una respuesta de daño al DNA que conduce a la parada irreversible del ciclo celular (d'Adda di Fagagna F 2003)
- **Paraptosis:** es una forma de muerte celular inducido en muchos tipos celulares por la expresión del receptor I del factor de crecimiento semejante a la insulina. Se caracteriza por la presencia de vacuolas en el citoplasma y el aumento de tamaño de las mitocondrias. Sin embargo no presenta otros rasgos característicos de la apoptosis, ni se puede evitar con inhibidores de caspasas o por la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas (Sperandio et al. 2000).
- **Piroptosis:** tipo de muerte celular que ocurren en macrófagos infectados por patógenos y producida por la activación de la proteasa caspasa-1.
- **Entosis:** descrita inicialmente como una forma de “canibalismo celular” en linfoblastos de pacientes con la enfermedad de Huntington (Overholtzer et al. 2007). Consiste en la fagocitosis de una célula por parte de otra célula vecina, causando la muerte de la primera dentro del fagosoma. Curiosamente unas de las células con mayor capacidad de realizar entosis son las de cáncer de mama MCF7, las cuales son deficientes en apoptosis y autofagia. Esto podría indicar que es una vía defectuosa que solamente se observa en aquellos casos en que otras vías catabólicas están suprimidas.

## 2.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA APOPTOSIS

Las señales apoptóticas conducen a la activación de un conjunto de procesos bioquímicos y moleculares que llevan a la muerte de la célula y a la ingestión de ésta por parte de células fagocíticas como macrófagos, células dendríticas inmaduras, células endoteliales o fibroblastos (Savill et al. 2002) . Esta fagocitosis está asociada con la liberación de factores antiinflamatorios por lo que, salvo en determinados casos, la apoptosis cursa en ausencia de inflamación (Voll et al. 1997; Nagata et al. 2010).

Existen dos rutas de señalización diferentes que pueden conducir a la muerte por apoptosis (Figura 2.1):

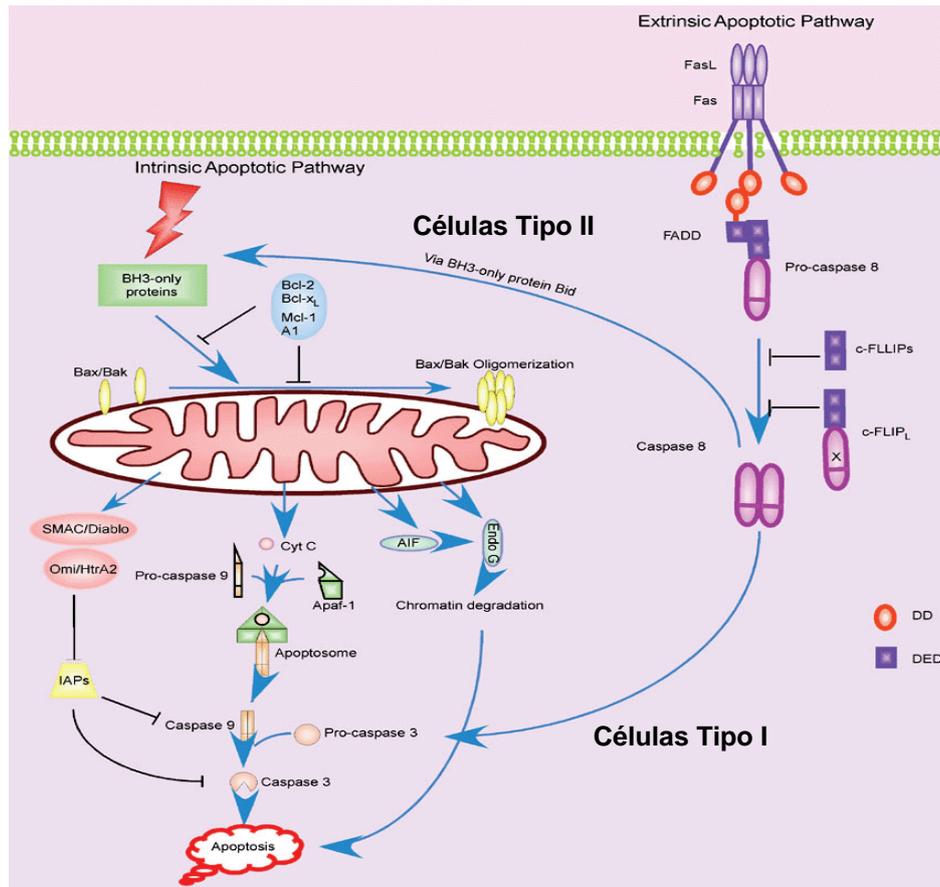
- Vía extrínseca o de receptores mortales.
- Vía intrínseca o mitocondrial.

Una característica común de las dos vías es la activación de las enzimas proteolíticas **caspasas** que, en última instancia, van a llevar a cabo el desmantelamiento de la célula.

### **2.2.1 La vía extrínseca o de receptores mortales.**

La vía extrínseca de la apoptosis se desencadena cuando los denominados ligandos mortales se unen a sus receptores de muerte en la superficie de la célula y se inicia una ruta de transducción de señales en la que están implicadas diferentes moléculas adaptadoras y las caspasas (Ashkenazi and Dixit 1998) (Figura 2.1).

Dentro de los ligandos de muerte destacan el TNF- $\alpha$ , FasL y Apo2L/TRAIL, todos ellos miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La mayoría de los miembros de esta familia están implicados en la activación de respuestas proinflamatorias; sin embargo también juegan un papel en la activación de la apoptosis. La unión de estas proteínas a sus receptores correspondientes (TNFR, Fas y DR4 o DR5, respectivamente) a través de los dominios de muerte DD causa un cambio conformacional de los receptores, de manera que oligomerizan y pueden reclutar la proteína adaptadora FADD (Strasser et al. 2000; Ashkenazi 2002). Después FADD es capaz de reclutar a la procaspasa-8 a través de sus dominios DED formando un complejo denominado DISC (Death-inducing signalling complex). En este complejo se da la activación de la caspasa 8 que es posteriormente liberada al citosol donde llevará a cabo la activación de caspasas efectoras (Lavrik et al. 2003) (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Vía extrínseca de la apoptosis y conexión con la vía intrínseca. Modificado de (Zhang et al. 2005).

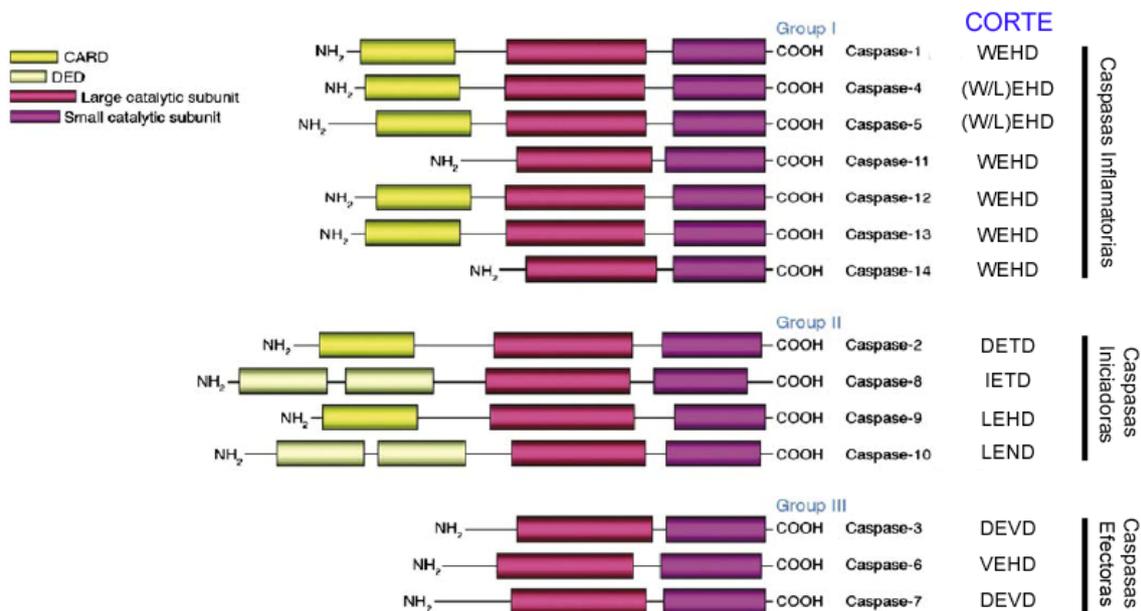
En función de la dependencia del DISC para activar las caspasas ejecutoras las células se pueden clasificar en dos subgrupos (Scaffidi et al. 1998; Ozoren and El-Deiry 2002) (Figura 2.1):

- Las **células tipo I** se caracterizan por tener altos niveles de formación del DISC y por lo tanto de caspasa 8 activa. Ésta, va a llevar a cabo la activación de caspasas efectoras como la 3 y la 7.
- En las llamadas **células tipo II** hay poco nivel de formación de DISC y necesitan conectar con la vía intrínseca (apartado 2.3) para amplificar la señal de activación de caspasa 3 (Medema et al. 1998). La caspasa 8 activa en estas células proteoliza a la proteína Bid, perteneciente a la familia Bcl-2 (ver apartado 2.4) y la proteína generada por el corte, tBid, es capaz de conectar con la vía mitocondrial (Luo et al. 1998) e inducir la activación de Bak y Bax y la consiguiente permeabilización mitocondrial y activación de la caspasa 9 (Zhang et al. 2004) (Figura 2.1).

## 2.2.2 Caspasas.

Las caspasas pertenecen a una familia de proteasas cuyo centro activo consta de un residuo nucleofílico de cisteína (Alnemri et al. 1996) que reconoce motivos de cuatro aminoácidos, el último de los cuales es un aspártico tras el que realizan el corte (Nicholson and Thornberry 1997).

En mamíferos se han descrito 14 miembros dentro de la familia de caspasas, de los cuales hay 12 miembros presentes en humanos. Las caspasas se pueden clasificar según su función en tres grandes grupos: caspasas **iniciadoras** y **efectoras** de la apoptosis y caspasas implicadas en procesos de **inflamación**. La siguiente figura recoge información acerca de la estructura de las caspasas de los tres tipos y la secuencia de corte que reconocen.

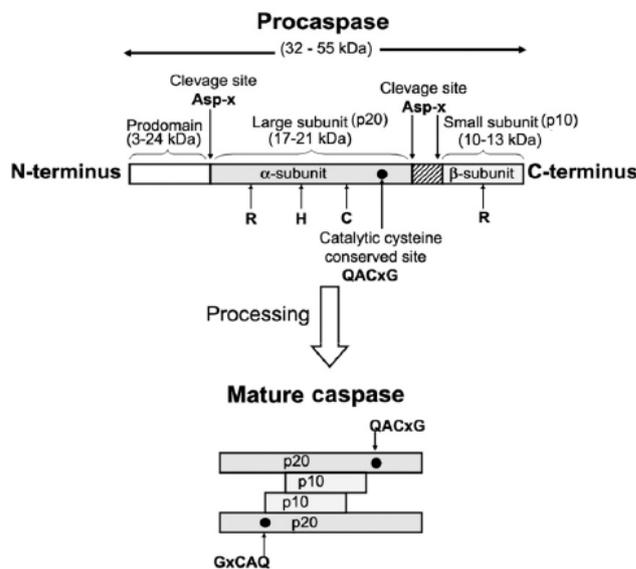


**Figura 2.2 Esquema de la estructura de caspasas y secuencia reconocida por cada una para el corte proteolítico.** Modificado de (Rupinder et al. 2007). **CARD**: Dominio de Reclutamiento de Caspasas. **DED**: Dominio Efecto de Muerte.

En general, las caspasas se sintetizan como zimógenos (Gerald 1997), es decir, una conformación no activa que se denomina **procaspasas**. Estudios estructurales han demostrado que las caspasas se sintetizan como una cadena polipeptídica de entre 32 y 55 kDa que tienen 2 dominios en común: un dominio central grande (p20) que contiene el sitio activo, un dominio C-terminal (p10) también llamado subunidad catalítica pequeña (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Las procaspasas tienen también un prodominio N-terminal de diferente longitud según el miembro de la familia. Mientras que las caspasas ejecutoras tienen un dominio N-terminal muy corto, el de

las caspasas implicadas en inflamación y el de las iniciadoras es más largo y contiene motivos como el **motivo de reclutamiento de caspasas** (CARD, caspase recruitment domain) y/o el **motivo efector de muerte** (DED, death effector domain) (Figura 2.2).

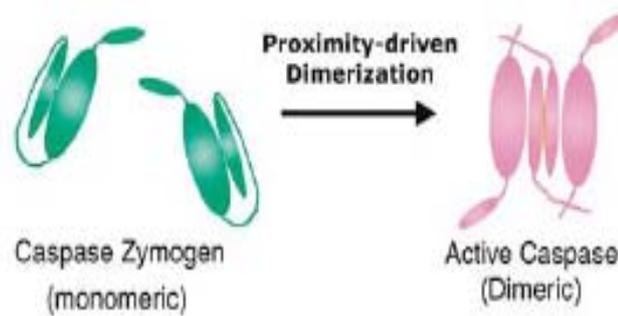
Para la activación de las procaspasas en respuesta a señales específicas se produce un procesamiento proteolítico entre los dominios p10 y p20 de la procaspasa en residuos específicos de aspártico. Las dos subunidades generadas interaccionan entre ellas y finalmente forman un heterotetrámero que contiene dos subunidades p10 y dos p20 (Nicholson 1999) (Figura 2.3). Destaca la presencia de un residuo de aspártico en el sitio de procesamiento de las procaspasas, lo cual concuerda con la capacidad de estas proteasas de autoactivarse o ser activadas por otros miembros de la familia generando cascadas de amplificación de la señal.



**Figura 2.3** Procesamiento de las procaspasas (Chowdhury et al. 2008).

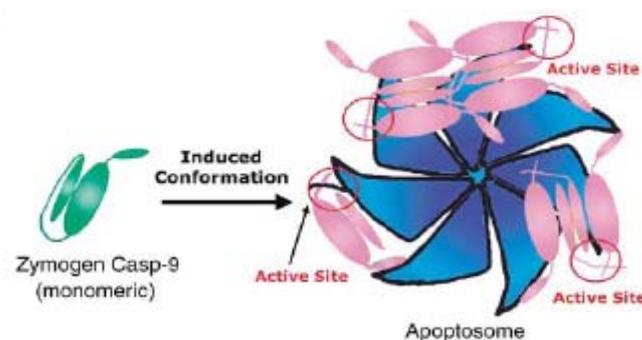
Para la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, que participan en la vía extrínseca de la apoptosis, se propuso el **modelo de proximidad** (Muzio et al. 1998; Boatright et al. 2003). Según éste, la unión de un ligando mortal a su receptor provoca la unión de la proteína adaptadora **FADD** (Fas Associated Death Domain) al receptor y FADD recluta a varias moléculas de procaspasa a través de sus dominios DED. A continuación hay un procesamiento en *trans* entre las moléculas de zimógenos debido a la proximidad existente entre ellas (Figura 2.4). En primer lugar una molécula de procaspasa procesa a otra cercana y después la propia molécula de caspasa 8 termina su autoproteolización y madura (Lavrik et al. 2003). Así, la activación de la caspasa 8 se da en el llamado complejo de señalización de muerte celular o DISC (ver

vía extrínseca) para después ser liberada en forma de heterotetrámero al citosol para activar la apoptosis.



**Figura 2.4 Modelo de activación por proximidad** (Bao and Shi 2007).

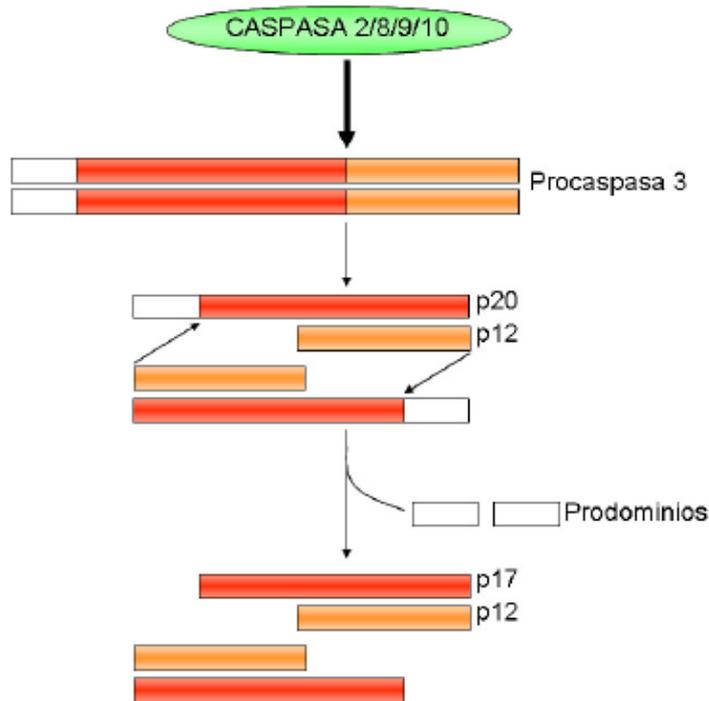
En cuanto a la caspasa iniciadora 9, que participa en la apoptosis mediada por la vía mitocondrial, es también necesaria la oligomerización de varias moléculas de zimógeno (Srinivasula et al. 1998) en este caso a través de la proteína adaptadora **Apaf-1** (Factor Activador de Proteasas Apoptóticas). El cambio conformacional de Apaf-1 inducido por la salida de citocromo c de las mitocondrias y la presencia de dATP, permite el reclutamiento de procaspasa-9 a través de los dominios CARD y la oligomerización formando un complejo macromolecular de alrededor de 1.4 MDa denominado **apoptosoma** (Acehan et al. 2002) (Figura 2.5). Finalmente la activación de la caspasa 9 se da por un cambio alostérico en su conformación y posterior dimerización (Rodríguez and Lazebnik 1999; Boatright et al. 2003).



**Figura 2.5 Modelo de activación por cambio conformacional** (Bao and Shi 2007).

La activación de caspasas efectoras 3, 6 y 7 se da en un proceso que comprende dos fases (Han et al. 1997) y que se describe en la figura 2.6. Primeramente, hay un procesamiento entre sus subunidades (p20 y p12). Después se da la dimerización de

estas subunidades y el autoprocésamiento de un dominio del extremo N-terminal de p20 generando una nueva subunidad, p17. La oligomerización de p17 y p12 da lugar a la conformación activa. Según esto, las moléculas de procaspasa efectora deben estar formando dímeros en el citosol para poder ser procesadas por las caspasas iniciadoras y que se forme la estructura heterotetramérica.



**Figura 2.6 Mecanismo de activación de la caspasa efectora 3** (Aguiló Anento 2009).

### 2.2.2.1 Inhibidores de caspasas.

Los procesos de procesamiento y activación de caspasas están altamente controlados en las células con diferentes mecanismos para activarlos o inhibirlos. Se conocen diversos reguladores de caspasas que actúan bloqueando las caspasas a nivel del DISC o inhibiendo su actividad enzimática.

- **IAPs** (Inhibitors of Apoptosis): son proteínas celulares capaces de bloquear los sitios activos de las caspasas inhibiendo su actividad proteasa. Estas proteínas pueden inhibir a la procaspasa-3 por lo que bloquean la cascada de proteólisis y ofrecen protección frente a la apoptosis que pudiera inducirse a partir de la caspasa 8 (Deveraux and Reed 1999). El miembro más importante es XIAP (X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein) capaz de inhibir tanto a caspasas efectoras como a la caspasa 9.

- Proteínas **c-FLIP**: son homólogos de caspasas inactivos por alteración en su sitio activo. Cuando se encuentran sobreexpresados en la célula, son capaces de inhibir la activación de la procaspasa-8 en el DISC (Thornberry and Lazebnik 1998).

## 2.3 VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL DE LA APOPTOSIS.

La vía intrínseca de la apoptosis se activa por señales de estrés intracelular como daño al DNA, producción de especies reactivas de oxígeno, infecciones virales, falta de factores de crecimiento o acumulación en el retículo endoplásmico de proteínas mal plegadas (Shibue and Taniguchi 2006; Youle and Strasser 2008). Todos estos estímulos inducen o activan a las proteínas proapoptóticas de la **familia Bcl-2** (apartado 2.4) que controlan, mediante interacciones entre ellas, la activación de las proteínas efectoras Bax y Bak para que lleven a cabo la permeabilización de las membranas mitocondriales (Figura 2.1). En la siguiente etapa de la ruta distintos factores apoptogénicos, como el citocromo c son liberados del espacio intermembrana mitocondrial al citosol celular. La salida de citocromo c activa la formación del apoptosoma y de la procaspasa 9. Finalmente la caspasa 9 activa llevará a cabo el procesamiento de las caspasas efectoras 3 y 7 iniciando la cascada de muerte celular. Destaca también el papel de tBid conectando con la vía intrínseca las señales apoptóticas activadas por granzima B (Barry et al. 2000) y por receptores mortales en células de tipo II (Luo et al. 1998).

### 2.3.1 Papel de la mitocondria y sus cambios estructurales durante la apoptosis.

Las mitocondrias son orgánulos implicados en la regulación de procesos indispensables para la célula como la homeostasis del calcio, la producción de energía, la proliferación celular, la senescencia y respuesta a estímulos fisiopatológicos y de estrés genético (Rasola and Bernardi 2007). Como se ha mencionado anteriormente este orgánulo es clave en la vía intrínseca de la apoptosis; además de participar también en la vía extrínseca (con tBid como mediador) así como en la ruta de apoptosis activada por granzima B (iniciada por linfocitos T citotóxicos y células NK, “natural killer”, para la eliminación de células cancerosas o infectadas por virus) (Sheridan and Martin 2010). Cuando hay un estímulo de activación de muerte de la célula que es lo suficientemente fuerte como para romper el equilibrio muerte/supervivencia celular, se producen una serie de cambios ultraestructurales y

fisiológicos en las mitocondrias que conducen a la célula a un punto de “no retorno”. Esto lleva a la liberación de los factores apoptogénicos que en última instancia efectúan el desmantelamiento de la célula (Cereghetti and Scorrano 2006).

Además, las mitocondrias forman una red compleja que se extiende por toda la célula y están constantemente elongándose y dividiéndose mediante los procesos de **fusión y fisión** (Sheridan and Martin 2010). El proceso de fusión mitocondrial consiste en la unión de dos mitocondrias por fusión de sus membranas externa e interna para facilitar el intercambio de DNA y proteínas entre ellas. En él, participan las proteínas mitofusina 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), dos GTPasas localizadas en la membrana mitocondrial externa (Eura et al. 2003), así como Opa1, una proteína situada en la membrana mitocondrial interna y que participa en el mantenimiento de las crestas mitocondriales (Olichon et al. 2003). En el proceso de fisión está implicada la proteína citosólica Drp1 que es reclutada hacia las mitocondrias en los denominados sitios de constricción donde, al multimerizar en forma de espiral alrededor de la mitocondria, es capaz de fisiónarla.

Uno de los cambios principales que se da en las mitocondrias durante la apoptosis es la remodelación de sus crestas. Se ha sugerido que en respuesta a un estímulo apoptótico las crestas mitocondriales se fusionen y que haya un ensanchamiento en las llamadas uniones de contacto entre las crestas. Así, el citocromo c que se localiza en un 85% en estas crestas puede redistribuirse al espacio intermembrana y ser liberado a continuación a través de la membrana mitocondrial externa (Scorrano 2009). Parece ser que el desensamblaje de oligómeros de Opa1 y disposición en forma de monómeros, es responsable del ensanchamiento de las crestas y permite la liberación total de citocromo c y progreso de la cascada apoptótica (Perkins et al. 2009; Wasilewski and Scorrano 2009).

Por otro lado también se ha observado que durante la apoptosis se produce un incremento de la fisión mitocondrial y una inhibición de la fusión, lo cual lleva a que se produzca **fragmentación mitocondrial**. Se ha podido detectar reclutamiento de Drp1 a la membrana externa de la mitocondria, en sitios que se cree que sea donde se da preferentemente la oligomerización de Bak/Bax (Karbowski et al. 2002). Sin embargo, existe controversia acerca de la relación causal entre la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la fisión mitocondrial (Parone et al. 2006; Jeong and Seol 2008).

### 2.3.2 Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP).

Las mitocondrias poseen una doble membrana que define cuatro compartimentos claramente diferenciados: la membrana externa (MME), el espacio intermembrana (IMS), la membrana interna (MMI) y la matriz mitocondrial. En condiciones normales, la MME es impermeable al paso de iones, permitiendo la existencia de un gradiente electroquímico de protones por el bombeo de protones desde la matriz al IMS, a través de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto genera un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), y es imprescindible para que, a partir de ADP la ATP Sintetasa genere moléculas de ATP.

Existe una cierta controversia en cuanto a la forma en que ocurre la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, pudiéndose diferenciar un modelo que implica la permeabilización de ambas membranas mitocondriales mediante un poro (PTP) o la permeabilización directa de la membrana externa mitocondrial (MOM) por parte de Bax y/o Bak.

- **PTP (permeability transition pore)**

Es un canal dependiente de voltaje y de calcio, que permite el paso de solutos de hasta 1500 kDa a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) (Crompton 1999; Rasola and Bernardi 2007). Este PTP forma un complejo supramolecular con componentes de todos los compartimentos mitocondriales: a) VDAC, un canal iónico dependiente de voltaje de la membrana mitocondrial externa, b) el translocador de nucleótidos de adenina de la membrana mitocondrial interna, ANT y c) la ciclofilina D presente en la matriz mitocondrial. Se ha descrito que este poro pueda estar regulado por proteínas de la familia Bcl-2, pudiendo ser inhibido por proteínas antiapoptóticas (Marzo et al. 1998a), o bien participando Bax en su ensamblaje (Marzo et al. 1998b). Sin embargo, el PTP puede también formarse sin participación de las proteínas de la familia Bcl-2 (Scorrano et al. 2002), en un proceso dependiente de calcio (Huang et al. 2000) y de estrés oxidativo (Madresh and Hajnoczky 2001).

Según este modelo la conexión de la matriz mitocondrial con el citosol causaría un choque osmótico en la mitocondria con la consiguiente ruptura de la membrana externa y salida de factores apoptogénicos. Además, aunque la membrana mitocondrial interna no llega a fragmentarse, sí que sufre una permeabilización que lleva consigo la salida de protones de manera indiscriminada y se da por ello un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y de la formación de ATP que contribuye a aumentar la disfunción mitocondrial (Marchetti et al. 1996). La

consecuencia inmediata es la disminución del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zamzami et al. 1995; Chen et al. 2003) seguido de la depleción de ATP (Crompton 1999). La presencia de ROS produce una serie de reacciones en la mitocondria, como es la peroxidación lipídica de la cardiolipina, que pueden favorecer la activación de la ruta intrínseca generando un bucle de retroalimentación positiva (Petrosillo et al. 2003).

Además, las propias caspasas tienen como sustratos algunos componentes de la cadena de transporte electrónico, pudiendo a su vez amplificar esta señal (Marzo et al. 1998b).

### ▪ **MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel)**

Es un canal de naturaleza proteica que se propone que formen las proteínas Bak y Bax en la membrana mitocondrial externa (Korsmeyer et al. 2000; Saito et al. 2000). Esta posibilidad se propuso al observar que estas proteínas adoptaban una estructura en horquilla que podría formar poros similares a los de toxinas bacterianas (Schlesinger et al. 1997; Schendel et al. 1998). Existen estudios con liposomas que demuestran que Bak y Bax pueden formar poros en las membranas con la ayuda de tBid y permitir la salida de citocromo c de manera independiente al poro PTP (Kuwana et al. 2002). Así, se ha propuesto que Bax pueda formar este MAC (Martinez-Caballero et al. 2005) y se ha calculado que este canal pueda contener sobre 10 monómeros de Bax para poder permitir la salida de moléculas como citocromo c (Martinez-Caballero et al. 2009). Así como se ha podido demostrar que Bax es un componente de este MAC (Dejean et al. 2005), se ha sugerido que en células carentes de Bax, la función de éste pueda ser reemplazada por Bak (Dejean et al. 2010).

A diferencia del modelo PTP, el MAC no induciría despolarización en la mitocondria y se mantiene la integridad de la membrana mitocondrial externa. Además, se ha observado que proteínas pequeñas como citocromo c y Smac/DIABLO son liberadas de la mitocondria antes que otras proteínas más grandes, como AIF o EndoG, por lo que es posible que MAC sea responsable de la liberación de moléculas pequeñas y que otro proceso posterior llevara a cabo la liberación de las proteínas más grandes. Esto ha llevado a plantearse que ambos procesos de permeabilización actúen de forma sinérgica para maximizar la salida de citocromo c y la progresión de los procesos de muerte celular (Rasola and Bernardi 2007; Kinnally et al. 2011).

### ▪ **Poros Lipídicos**

Diversos trabajos proponen que la permeabilización de la membrana mitocondrial externa pueda darse por la interacción de moléculas de Bak y Bax activas con lípidos

de la membrana que, en última instancia formarían poros que permitirán el paso de proteínas apoptogénicas hacia el exterior (Basanez et al. 1999; Basanez et al. 2002; Tait and Green 2010). Recientemente se ha observado por criomicroscopía electrónica la formación de poros de naturaleza lipídica cuando Bax es activado por tBid y que, en ausencia de cardiolipina, proteínas de la membrana mitocondrial externa colaboran en la formación de estos poros (Schafer et al. 2009).

### 2.3.3 Salida de factores apoptogénicos y fase final de la apoptosis.

Al producirse la permeabilización de las mitocondrias se liberan desde el espacio intermembrana al citosol diversas proteínas con función apoptogénica que van a llevar a cabo la fase final de ejecución de la apoptosis (Newmeyer and Ferguson-Miller 2003; Saelens et al. 2004) (Figura 2.7). Dentro de estos factores apoptogénicos destacan:

**Citocromo c:** una vez en el citosol es capaz de causar un cambio conformacional en la proteína adaptadora Apaf-1, que podrá entonces oligomerizar en un proceso que requiere de la hidrólisis de ATP y formar el denominado apoptosoma. Una vez formada esta estructura, cada molécula de Apaf-1 se asocia a una molécula de caspasa 9 a través de sus dominios CARD y ésta adopta su conformación activa (Acehan et al. 2002). Así, la caspasa 9 activa será capaz de activar a las caspasas ejecutoras 3 y 7 que procederán a la proteólisis de diferentes sustratos celulares.

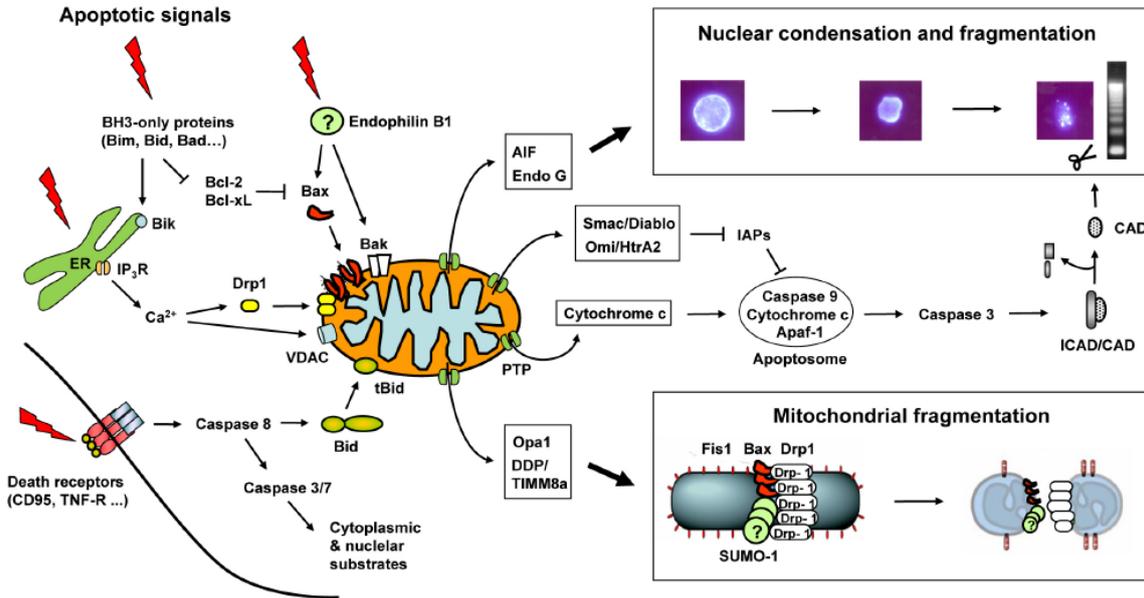
**Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases)/(Direct IAP binding protein with low pI):** es capaz de inhibir la acción de los inhibidores de apoptosis, IAPs, al romper la unión de estos a la caspasa 9 activa y caspasas ejecutoras (Verhagen et al. 2000).

**OMI/HtrA2 (High temperature requirement protein 2):** es una serin proteasa que en condiciones fisiológicas se localiza en el espacio intermembrana y tiene función de chaperona que degrada o “re-plega” proteínas mitocondriales mal plegadas. Cuando se induce la apoptosis y es liberada al citosol, esta proteína es capaz de unirse a los IAPs, liberando así las caspasas que podrán activarse y continuar la ejecución de la apoptosis (Srinivasula et al. 2003; Vande Walle et al. 2008). Esta proteína es también capaz de activar vías de apoptosis independientes de caspasas (Suzuki et al. 2001).

**AIF (Apoptosis Inducing Factor):** fue descrito originalmente por Susin y colaboradores (Susin et al. 1999) como una proteína capaz de, al ser liberada de la

mitocondria al citosol, inducir muerte celular independiente de caspasas. En condiciones normales AIF es una flavoproteína, con función oxidorreductasa/NADH oxidasa que podría formar parte del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Vahsen et al. 2004; Vaux 2011). Sin embargo, cuando se activa la apoptosis, AIF es liberado al citosol y se trasloca al núcleo donde, probablemente junto a la endonucleasa G, produce la condensación de la cromatina y la fragmentación de DNA en fragmentos de alto peso molecular ( $\geq 50$  Kpb) (Susin et al. 1999; Broker et al. 2005). También se ha descrito que pueda inducir muerte mediante la inducción de producción de radicales libres (Lipton and Bossy-Wetzel 2002), así como que la proteína antiapoptóticas Hsp70 pueda ejercer un control sobre la función apoptogénica de AIF por unión directa a él (Ravagnan et al. 2001).

**Endonucleasa G:** normalmente se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial, y tras un estímulo apoptótico se transloca al citosol y posteriormente al núcleo para llevar a cabo la fragmentación del DNA en fragmentos oligonucleosomales, similares a los generados por la DNasa activada por caspasas (CAD) (Lorenzo and Susin 2004).

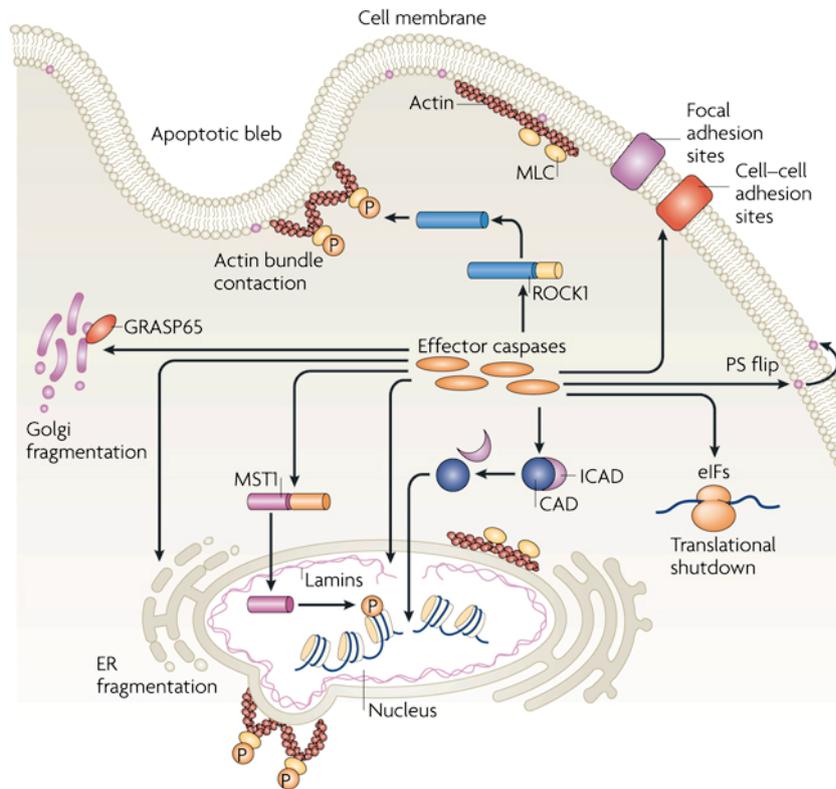


**Figura 2.7 Rutas extrínseca e intrínseca: activación de caspasas y salida de factores apoptogénicos** (Jeong and Seol 2008).

Además de la liberación de las proteínas mitocondriales con función apoptogénica descritas anteriormente, las caspasas ejecutoras que se activan por ambas rutas

apoptóticas llevan a cabo la destrucción de diferentes estructuras celulares. En conjunto estos procesos proteolíticos confieren a la célula los cambios fenotípicos característicos de la apoptosis. Se conocen alrededor de 400 sustratos de las caspasas, entre los que destacan (Luthi and Martin 2007):

- **iCAD**: es un inhibidor de la desoxirribonucleasa CAD, que al ser proteolizado libera a CAD, que será capaz de entrar al núcleo y catalizar la fragmentación del DNA internucleosomal.
- **Láminas A/C**: son proteínas estructurales de la membrana nuclear. Al ser proteolizadas se provoca un debilitamiento de esta membrana. La proteólisis conjunta de la red de filamentos de actina que rodea el núcleo provoca la fragmentación de éste.
- Componentes del citoesqueleto: la acción de las caspasas sobre los microfilamentos de actina contribuye a la retracción y redondeamiento que presentan las células en estadios de apoptosis tempranos. Además, esto provoca la contracción de filamentos de actina corticales dando lugar a las burbujas o “blebs” característicos de la apoptosis.
- La proteólisis de proteínas implicadas en la adhesión celular, como las  $\beta$ -cateninas (uniones entre células) o proteínas que participan en adhesiones focales, provocan la rotura de adhesión entre diferentes células y de éstas con la matriz extracelular.
- Muchos factores de transcripción y traducción son procesados por caspasas, lo cual resulta en un bloqueo transcripcional y traduccional de la célula.
- Fragmentación de orgánulos como Golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias.



**Figura 2.8 Las caspasas coordinan la destrucción de estructuras celulares esenciales y de orgánulos** (Taylor et al. 2008).

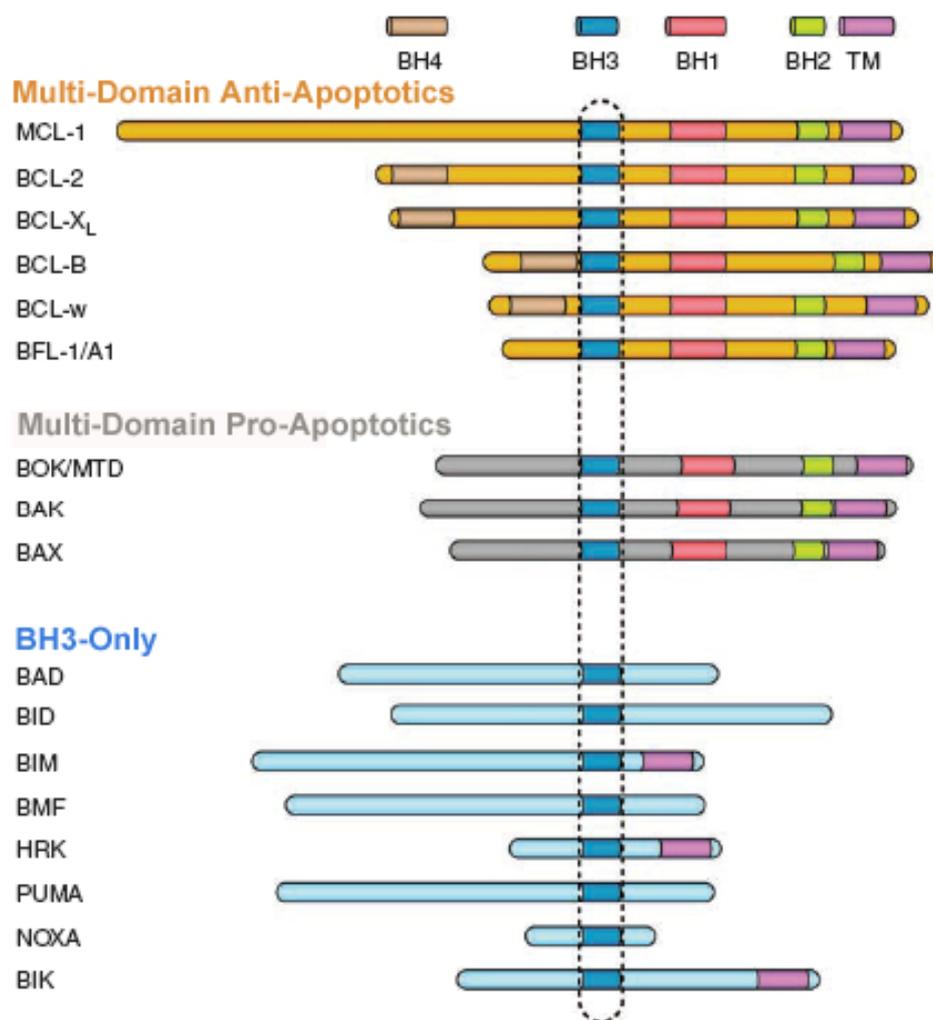
Finalmente la célula se fragmenta en los llamados cuerpos apoptóticos, proceso que facilita su fagocitosis. Para esta fagocitosis, es necesario que se expresen ciertos ligandos en su superficie. Destaca la translocación de fosfatidilserina (PS) a la cara externa de la membrana, proceso dependiente de caspasas.

## 2.4 LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 se encargan de regular la fase de inducción de la apoptosis por la vía intrínseca, controlando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y fase posterior de activación de caspasas. Estas proteínas se caracterizan por compartir en su estructura al menos uno de los dominios conservados BH (dominios de homología a Bcl-2). No obstante, un dominio se define como una estructura tridimensional conservada que se pliega de manera independiente al resto

de la proteína. Los llamados “dominios” BH, sin embargo, son partes integrales la estructura tridimensional compacta de las proteínas Bcl-2. Solamente el dominio BH3 y la cola C-terminal de anclaje en membranas parecen tener identidad estructural y funcional propia (Lindsay et al. 2010).

Por lo tanto, se pueden clasificar las proteínas de esta familia en tres subgrupos de acuerdo a su estructura primaria y función (Cory and Adams 2002): proteínas **antiapoptóticas**, proteínas **proapoptóticas multidominio** y **proapoptóticas “sólo-BH3”**.



**Figura 2.9** Esquema de la estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 (Danial 2008). **BH1-BH4:** dominios de homología con Bcl-2; **TM:** fragmento transmembrana.

- **Proteínas antiapoptóticas**

Los miembros más importantes de este grupo son las proteínas Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1/A1 y Mcl-1, las cuales contienen los cuatro dominios de homología a Bcl-2, BH1-BH4; salvo Mcl-1 y A1 que carecen del dominio BH4. Los dominios BH1, BH2 y BH3 forman una cavidad hidrofóbica que es el sitio de unión del dominio BH3 de las proteínas proapoptóticas (Sattler et al. 1997; Cory and Adams 2002). El dominio BH4 se ha propuesto que sea el responsable de la función antiapoptótica de estas proteínas (Sugioka et al. 2003). Se ha descrito que la delección de dicho dominio en las proteínas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> inactiva su función antiapoptótica aunque sin modificar su capacidad de unirse a los miembros proapoptóticos de la familia (Huang et al. 1998). Sin embargo, los dos miembros que no presentan este dominio, Mcl-1 y A1, son capaces de ejercer su función antiapoptótica por lo que no está clara la implicación de este dominio (Hossini and Eberle 2008).

Estas proteínas se localizan principalmente en la cara citosólica de la membrana mitocondrial así como en retículo endoplásmico y membrana nuclear, aunque en determinados casos también se ha descrito que se puedan localizar en el citosol de células sanas y que se redistribuyan hacia las membranas tras un estímulo apoptótico (Wang et al. 1996; Adams 2003). Se sugiere que sea el dominio C-terminal el que dirige a estas proteínas a las membranas de los orgánulos (Kaufmann et al. 2003).

**Bcl-2** (B cell lymphoma-2 protein): se identificó sobre los años 80, como el producto de una translocación entre los cromosomas 14 y 18 t(14;18)(32; q21) (Bakhshi et al. 1985). Esta translocación conlleva la fusión del oncogen bcl-2 al gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas H, quedando bajo el control de un “enhancer” de las IgH. Esto causa una desregulación de la expresión del gen Bcl-2 a nivel transcripcional (Reed 2008). Esta alteración se encuentra en aproximadamente el 80% de los pacientes con linfoma no-Hodgkin (Cerroni et al. 1994). Como se revisa en (Reed 2008), Bcl-2 se encuentra sobreexpresado en muchos tumores y esto de ha relacionado con una elevada resistencia a drogas empleadas en quimioterapia (Kirkin et al. 2004).

Bcl-2 presenta en su secuencia los cuatro motivos BH y se ha descrito su presencia en la membrana mitocondrial externa (Baffy et al. 1993; Krajewski et al. 1993), retículo endoplásmico (Lam et al. 1994) e incluso membrana nuclear (Ryan et al. 1994; Hoetelmans et al. 2000).

**Bcl-X<sub>L</sub>** (B cell lymphoma extralarge proteína): es una proteína esencial para la supervivencia de eritrocitos y neuronas (Motoyama et al. 1995; Strasser 2005). Como se ha mencionado para Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> también se encuentra sobreexpresada en

muchos tipos de cánceres lo cual se ha relacionado con mal pronóstico de la enfermedad (Cory and Adams 2002). Además esta proteína está regulada transcripcionalmente por la vía de supervivencia celular NK-KB (Fennell et al. 2008) y por IL-6 (Schwarze and Hawley 1995)

Bcl-X<sub>L</sub>, al igual que Bcl-2, contiene los cuatro dominios BH y se ha descrito su presencia en el citosol de varios tipos celulares. En estos casos Bcl-X<sub>L</sub> se transloca a la mitocondria al inducirse la apoptosis (Hsu et al. 1997; Kaufmann et al. 2003).

Tanto Bcl-X<sub>L</sub> como Bcl-2 se han relacionado recientemente con la inhibición de la autofagia mediada por Beclina, mediante su unión a dicha proteína e inhibición de la formación del autofagosoma (Yip and Reed 2008). De esta manera ambas proteínas podrían actuar ayudando a las células a evadir la muerte por autofagia (Zhou et al. 2010).

Algunos autores han observado que la sobreexpresión Bcl-X<sub>L</sub> es más potente que la de Bcl-2 en la prevención de apoptosis inducida por diferentes drogas, llegando a tener 10 veces más de efecto protector frente a doxorubicina en células de cáncer de mama (Fiebig et al. 2006).

**Mcl1** (Myeloid cell leukaemia-1): se identificó el año 1993 como una proteína cuya expresión aumentaba en la diferenciación de células mieloides (Kozopas et al. 1993). Mcl-1 se expresa en muchos tipos celulares tanto en el individuo adulto como durante el desarrollo embrionario (Rinkenberger et al. 2000). Además, es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de linfocitos B y T (Opferman et al. 2003) así como se ha visto que su eliminación hace aumentar la apoptosis de células malignas. Su localización es principalmente en la membrana externa mitocondrial aunque también se ha observado que puede localizarse en la membrana nuclear así como en el citosol (Thomas et al. 2010). Mcl-1 se encuentra regulada a tres niveles. Transcripcionalmente es inducida por diferentes factores de crecimiento y citoquinas a través de vías de señalización dependientes de MAPK, PI3K, JAK y STAT (Craig 2002). A nivel post-transcripcional se ha observado la presencia de isoformas más pequeñas de Mcl-1 originadas por procesos de splicing alternativo (Bae et al. 2000). A nivel post-traducciona se ha descrito que puede ser sustrato de caspasas (Weng et al. 2005) así como de quinasas (JNK, GSK) (Inoshita et al. 2002; Maurer et al. 2006), que dan lugar a isoformas que han perdido la capacidad antiapoptótica característica de Mcl-1.

A diferencia de los otros miembros antipoptóticos Mcl-1 carece del dominio BH4 y en su extremo N-terminal presenta dos dominios PEST. Estos dominios, ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, son los responsables de la corta vida media de Mcl-1 (Michels et al. 2005), que se ha determinado que pueda rondar los 40

minutos (Nijhawan et al. 2003). La degradación de Mcl-1 se da principalmente vía proteasoma (tras su ubiquitinación por parte de la proteína MULE) (Zhong et al. 2005). La rápida inducción y degradación de Mcl-1 sugiere que esta proteína pueda tener un papel esencial en el control de la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Craig 2002).

- **Proteínas Proapoptóticas Multidominio**

Dentro de este grupo destacan las proteínas **Bak**, **Bax** y **Bok**, siendo las dos primeras las más estudiadas. Estas proteínas presentan en su estructura los dominios BH1, BH2 y BH3 y en condiciones normales se encuentran en forma de monómeros inactivos. Bak se localiza anclada en la membrana mitocondrial externa mientras que Bax se encuentra en el citosol y en menor proporción asociado a la membrana externa de las mitocondrias (Suzuki et al. 2000). Bak también se ha descrito que pueda estar asociada a proteínas antiapoptóticas como Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1 y al translocador de nucleótidos de adenina (ANT), así como a la proteína 2 del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC-2) (Marzo et al. 1998a; Willis et al. 2005).

La inducción de la vía intrínseca por diferentes estímulos apoptóticos lleva a la activación de las proteínas **Bak** y **Bax**. Sin embargo, las interacciones que ocurren entre las proteínas de la familia Bcl-2 y el mecanismo por el que Bak y Bax se activan son cuestiones que continúan siendo controvertidas. En apartados posteriores se describe de manera más detallada los modelos propuestos para la activación de estas proteínas y su papel en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

En cuanto a la proteína **Bok**, se ha detectado principalmente en hígado, cerebro y órganos linfoides. Se ha visto que contribuye en la apoptosis dependiente de p53 inducida en neuroblastoma y cáncer de mama y parece que su dominio BH3 no está implicado en esta activación de la apoptosis (Hossini and Eberle 2008).

Además de las anteriores, existen otras proteínas multidominio con actividad proapoptótica. **Bcl-Rambo** contiene los 4 dominios BH y su actividad proapoptótica reside en la región transmembrana (Kataoka et al. 2001). Además, no se ha visto que sea capaz de interactuar con otros miembros de la familia. **Bcl-G**, presenta dos isoformas, pero tan solo la larga es capaz de unirse a Bcl-X<sub>L</sub> (Guo et al. 2001). Y finalmente **Bfk**, que se localiza en el citosol debido a la falta de dominio transmembrana y para la que tampoco se ha detectado unión de a otros miembros de la familia Bcl-2 (Coultas et al. 2003).

- **Proteínas Proapoptóticas “sólo-BH3”**

Las proteínas de este grupo solamente comparten con el resto de miembros de la familia el dominio BH3. Dentro de esta subfamilia destacan las proteínas **Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, bNIP3, Hrk, Noxa, PUMA y Spike**.

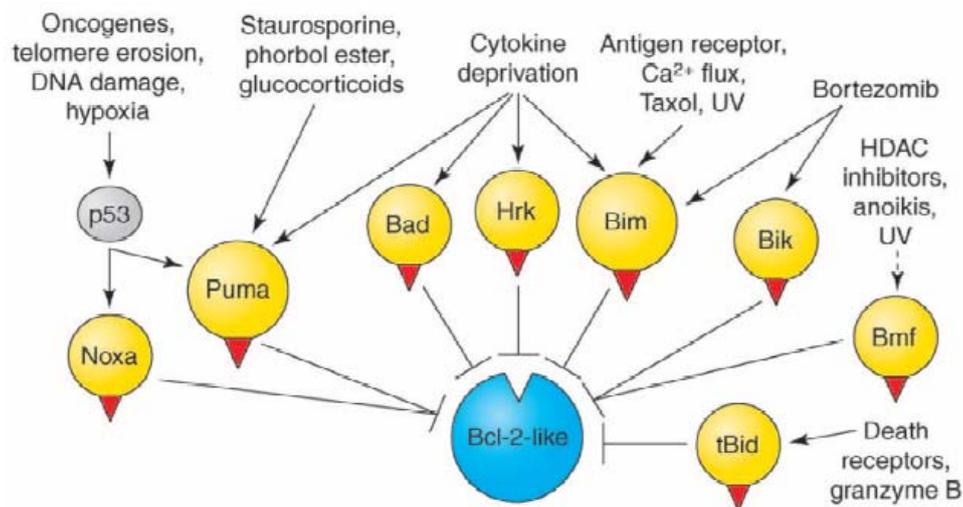
La función del dominio BH3 así como la identificación de la primera proteína “sólo-BH3” Bik tuvo lugar el año 1995 (Boyd et al. 1995). La relevancia fisiológica de los miembros “sólo-BH3” como moléculas efectoras de muerte en animales se demostró mediante estudios genéticos en *Caenorhabditis elegans*, en el que se identificó la proteína “sólo-BH3” EGL-1, cuya actividad está ligada a su interacción con CED-9, el ortólogo en gusano de BCL-2 (Conradt and Horvitz 1998). Estudios filogenéticos del dominio BH3 sugirieron que la parte central de este dominio estaba formada por un motivo LXXXXGDE, donde X es cualquier aminoácido y ni glicina ni ácido glutámico están estrictamente conservados (Lanave et al. 2004). Más recientemente se ha propuesto otro motivo consenso de 13 residuos basándose en estudios estructurales y análisis de secuencias (Day et al. 2008). La leucina y el ácido aspártico son los residuos más conservados y los más importantes en las interacciones con las proteínas antiapoptóticas a través de interacciones hidrofóbicas o iónicas, respectivamente (Hinds and Day 2005). Otros tipos de interacciones como van der Waals, hidrofóbicas o hidrofílicas se han determinado más recientemente entre el dominio BH3 y el bolsillo hidrofóbico de las proteínas antiapoptóticas formado por los dominios BH1-BH4 (Lama and Sankararamakrishnan 2008).

En condiciones normales estas proteínas o bien se encuentran en un estado inactivo o se expresan en niveles muy bajos. Cuando la célula recibe un estímulo apoptótico estas proteínas actúan como sensores de dicho estímulo y se produce su activación o una inducción de su expresión para que se active la apoptosis (Harris and Johnson 2001; Willis et al. 2003). El relativamente elevado número de proteínas “sólo-BH3” es un indicativo de la especialización que presentan. Cada una tiene localizaciones determinadas en la células, así como los estímulos y los mecanismos por los que se activan son también diferentes (Danial 2007). La actividad de las proteínas “sólo-BH3” está regulada a múltiples niveles:

- A nivel transcripcional se ha observado que estímulos apoptóticos activan la transcripción de determinadas proteínas: PUMA y Noxa son dianas transcripcionales de p53 en respuesta a daño en DNA (Oda et al. 2000; Nakano and Vousden 2001); Hrk es diana del factor de transcripción c-Jun en neuronas del cerebelo expuestas a privación de potasio (Ma et al. 2007). Por otra parte, las

señales de supervivencia promueven el silenciamiento transcripcional de los genes de proteínas “sólo-BH3”: El represor DREAM activado por IL-3 se une a la secuencia silenciadora de la región 3’ del gen Hrk inactivando su expresión (Sanz et al. 2001), mientras que los promotores de Bnip3, Noxa y Bik están silenciados epigenéticamente por metilación y acetilación de histonas en diferentes contextos celulares (Lomonosova and Chinnadurai 2008).

- A nivel de estabilidad de proteínas parece ser que hay una regulación en aquellas células en que la transcripción de los miembros “sólo-BH3” está constitutivamente activa, para prevenir una apoptosis no programada (Lomonosova and Chinnadurai 2008).
- Algunas proteínas “sólo-BH3” sufren modificaciones post-traduccionales para regular su actividad apoptótica: Bad es inactivada por fosforilación (Zhou et al. 2000); la fosforilación de Bim en la posición Thr112 hace disminuir su unión a Bcl-2 aumentando la supervivencia celular, mientras que si es fosforilada en Ser55, 65 y 73 se reduce su degradación por proteasoma aumentando la apoptosis (Hubner et al. 2008).
- A nivel de localización subcelular se distinguen algunas proteínas “sólo-BH3” como Bik, Bim, BNIP3 y Hrk que poseen dominio transmembrana implicado en su direccionamiento a membranas intracelulares (retículo endoplásmico y mitocondria) (Lomonosova and Chinnadurai 2008). PUMA es dirigida a la mitocondria por un dominio hidrofóbico en su extremo C-terminal (Nakano and Vousden 2001), mientras que la translocación de tBID es facilitada por N-miristoilación post-traduccional en un residuo de glicina expuesto tras el procesamiento de Bid por caspasa 8 (Zha et al. 2000).



**Figura 2.10 Activación de las proteínas “sólo-BH3” por diferentes tipos de estrés celular** (Willis and Adams 2005a).

**Bad** es una proteína que se activa en ausencia de factores de crecimiento para ejercer su función apoptótica. Sin embargo, en condiciones normales, es fosforilada por kinasas como PI3K/AKT, lo cual provoca un cambio en su localización intracelular, de la mitocondria al citosol donde se une a proteínas 14-3-3 que la mantienen inactiva (Danial 2008). Se han caracterizado diferentes fosfatasa que defosforilan a Bad, como la calcineurina, que liberan a Bad de las proteínas 14-3-3 y podrá unirse a proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Wang et al. 1999).

**Bid** se activa mediante proteólisis por la caspasa 8 al activarse la vía extrínseca de la apoptosis y es capaz de conectar, en células de tipo II, esa vía con la vía intrínseca (Li et al. 1998). También se ha observado activación de Bid por parte de otras proteasas como granzima B (Sutton et al. 2000), calpaína (Chen et al. 2001) y catepsinas (Stoka et al. 2001). En cuanto a su estructura es una proteína con mayor similitud a Bax que a las proteínas “sólo-BH3”. Una vez generado el fragmento truncado de Bid, tBid, éste se dirige a la mitocondria y se inserta en la membrana mitocondrial externa exponiendo su dominio BH3 que podrá activar a Bax. Se ha observado que la forma de integrarse en la membrana mitocondrial es muy similar a la de Bax (Billen et al. 2008b). Otros autores proponen que tBid interaccione con la cardiolipina presente en la membrana mitocondrial externa para integrarse en ésta (Terrones et al. 2008).

**Bik** fue el primer miembro de las proteínas “sólo-BH3” que se identificó, el año 1995 (Boyd et al. 1995). Se localiza principalmente en el retículo endoplásmico aunque también se ha detectado en mitocondrias, y parece ser que actúa a través de la señalización de calcio entre el retículo endoplásmico y la mitocondria (Chinnadurai et al. 2008).

**Bim** y **Bmf**: ambas proteínas se encuentran asociadas a componentes del citoesqueleto. Bim se encuentra unida en el citosol a la cadena ligera de la dineína, componente de complejo motor de los microtúbulos (Puthalakath et al. 1999) y Bmf se une a DLC2, componente del complejo motor de la miosina V (Puthalakath et al. 2001).

Bim presenta tres isoformas generadas por splicing alternativo, Bim<sub>EL</sub>, Bim<sub>L</sub> y Bim<sub>S</sub>, con diferente capacidad apoptótica (O'Connor et al. 1998). Mientras que las dos isoformas más grandes se expresan generalmente en todos los tejidos y líneas celulares, la isoforma Bim<sub>S</sub> no se expresa tanto, probablemente porque es la que mayor actividad proapoptótica tiene (Pinon et al. 2008). La estabilidad de esta proteína está regulada por el sistema ubiquitin-proteasoma, de manera que la fosforilación

mediada por el sistema ERK1/2 lleva a su liberación del citoesqueleto, a su ubiquitinización y posterior degradación en el proteasoma (Ley et al. 2003). Bim es regulado también a nivel transcripcional por el factor de transcripción FOXO3 en respuesta a la falta de citoquinas o por estrés del retículo.

Así como Bim es capaz de unirse a todos los miembros antiapoptóticos de la familia, Bmf se une preferentemente a Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-w (Chen et al. 2005).

Bim se ha visto implicado en la apoptosis de células hematopoyéticas así como de mielomas (Shibue and Taniguchi 2006; Lopez-Royuela et al. 2009) y Bmf es muy abundante en linfocitos B y T inmaduros (Pinon et al. 2008).

**bNIP3** parece ser la única proteína proapoptótica que ejerce su función a través de una región diferente del dominio BH3, estando implicados el dominio transmembrana y N-terminal. Además, desencadena una muerte celular independiente de Apaf-1 y de caspasas pero se la relaciona con la permeabilización de la membrana mitocondrial interna. Además, parece ser crítica para la inducción de autofagia por hipoxia (Hossini and Eberle 2008).

**Hrk o Harakiri** es capaz de interactuar con Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2. Se expresa en tejidos hematopoyéticos, páncreas, hígado, pulmón, riñón y próstata (Inohara et al. 1997). Su expresión se induce en neuronas por falta del factor de crecimiento neuronal o frente a tratamiento con beta-amiloide.

**Noxa** y **PUMA** son dianas del factor de transcripción p53 y parece que no requieren modificaciones posttraduccionales para ejercer su función.

PUMA es capaz de unirse a todas las proteínas antiapoptóticas de la familia mientras que Noxa sólo lo hace a Mcl-1 y A-1 (Chen et al. 2005). Se ha descrito que la unión de Noxa a Mcl-1 induce la degradación de la última a través del proteasoma (Willis et al. 2005).

Se han detectado al menos dos isoformas de PUMA,  $\alpha$  y  $\beta$ , (Nakano and Vousden 2001) cuya localización en la mitocondria depende de su dominio C-terminal (Yu and Zhang 2008). La expresión de PUMA es baja en condiciones normales, pero se induce rápidamente en respuesta a diferentes situaciones de estrés celular (Yu et al. 2001). Aunque se considera que PUMA es la proteína que media de manera principal la apoptosis dependiente de p53 en respuesta a daño en DNA, también se ha observado que Noxa juega un papel importante dependiendo de los estímulos desencadenantes de la apoptosis y del estado de otros genes (Villunger et al. 2003).

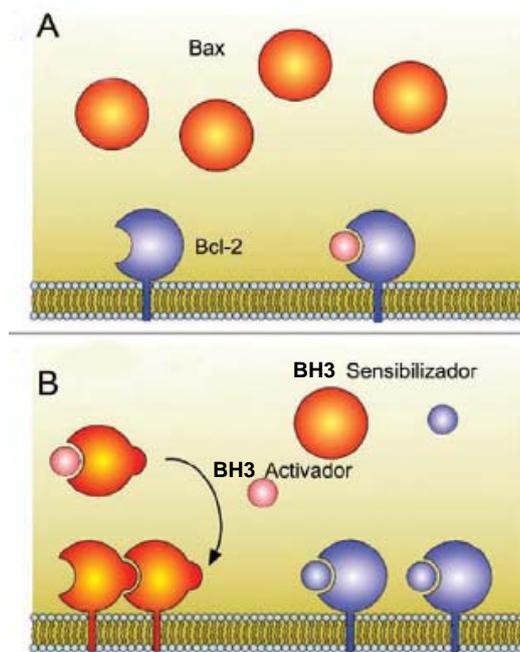
Hay ciertos estímulos como el estrés del retículo, la falta de citoquinas, glucocorticoides o hipoxia que son capaces de activar la transcripción de PUMA y Noxa e inducir apoptosis independiente de p53 (Kim et al. 2004; Ploner et al. 2008; Yu and Zhang 2008).

**Spike** presenta una localización diferente a otros miembros de la subfamilia, puesto que no se ha observado asociada al retículo endoplásmico (Mund et al. 2003). Además, no se ha detectado que interaccione con otros miembros de la familia Bcl-2, hecho probablemente indicativo de que activa vías de apoptosis independientes de interacciones mediante el dominio BH3 (Hossini and Eberle 2008).

### 2.4.1 Interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2.

Como se ha explicado anteriormente, las proteínas de la familia Bcl-2 se regulan mediante interacciones entre los diferentes miembros que llevan a la activación de las proteínas Bak y Bax, encargadas de permeabilizar las membranas mitocondriales para que se ejecute la fase final de la apoptosis. Sin embargo, a pesar de que se han realizado numerosos estudios para entender la forma cómo Bak y Bax se activan, los resultados obtenidos son en muchos casos contradictorios y no se ha podido llegar a un modelo de activación consensuado. Actualmente existen dos modelos principales que tratan de explicar cómo ocurre esta activación:

El **modelo directo** (Figura 2.11) defiende que existen proteínas “sólo-BH3” capaces de unirse y activar directamente a Bax y Bak. A éstas se las denomina **activadoras** y se ha sugerido principalmente que cumplan este papel Bid y Bim (Letai et al. 2002; Kuwana et al. 2005; Certo et al. 2006); aunque algunos trabajos también proponen a PUMA (Gallenne et al. 2009; Kim et al. 2009; Ren et al. 2010), p53 (Kim et al. 2006) y más recientemente a Noxa (Du et al. 2010; Dai et al. 2011) como proteínas activadoras. Por otro lado, según este modelo, el resto de las proteínas “sólo-BH3” serían proteínas **sensibilizadoras**, que se unirían a las antiapoptóticas liberando así a las activadoras para que activen a Bak y Bax.



**Figura 2.11 Modelo directo de activación de Bak y Bax.** **A.** En condiciones normales, las proteínas antiapoptóticas (esferas azules) están unidas y neutralizando a las proteínas “sólo-BH3” activadoras (esferas rosas). **B.** Al activarse la apoptosis, las proteínas “sólo-BH3” sensibilizadoras (esferas azules pequeñas) se unen a las antiapoptóticas, liberando a las activadoras que se unen directamente para activar a las moléculas de Bax (esferas naranjas) y provocan su translocación a la membrana mitocondrial externa. Adaptado de Fletcher y colaboradores (Fletcher and Huang 2008a; Galan-Malo 2010).

Algunos trabajos basados en péptidos sintéticos sugieren que los dominios BH3 de **Bid** y **Bim** son capaces de unirse directamente a Bak y Bax activándolos y provocando salida de citocromo c de las mitocondrias (Letai et al. 2002; Kuwana et al. 2005; Certo et al. 2006). También hay estudios que, empleando liposomas y la técnica FRET, han determinado que el fragmento truncado de Bid, t-Bid, es liberado por Bad de su unión a Bcl-X<sub>L</sub> y es capaz de activar a Bax (Lovell et al. 2008). Además, trabajos recientes han detectado por RMN la interacción entre Bax y Bim, que parece darse en una región de Bax diferente al dominio BH3, y que conduce a Bax a su oligomerización (Gavathiotis et al. 2008; Czabotar et al. 2009).

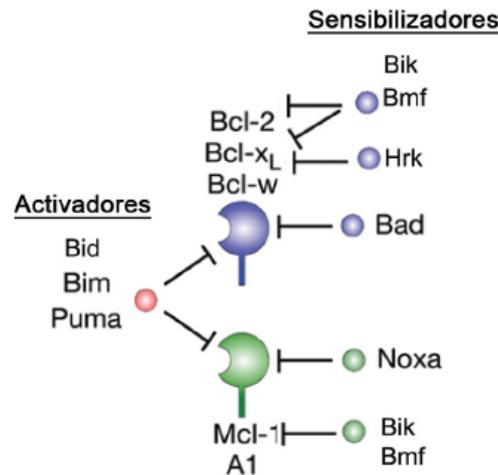
Otros autores proponen que PUMA pueda actuar como proteína activadora de Bax y Bak (Gallenne et al. 2009; Kim et al. 2009; Ren et al. 2010). Se ha descrito que PUMA interacciona con Bax en una región muy próxima a la determinada para Bim y que también dista del dominio BH3 de Bax, lo cual concuerda con datos publicados años antes (Cartron et al. 2004a).

Respecto a la proteína Noxa, se ha publicado recientemente que pueda tener un papel importante como activadora de Bax en ausencia de Bcl-X<sub>L</sub>; y que la presencia de Bad en un sistema basado en liposomas hace que Noxa pueda entonces activar a Bax (Du et al. 2010; Dai et al. 2011).

El papel de p53 también ha sido discutido en la literatura. Uno de los modelos propone que p53 se une a Bcl-X<sub>L</sub> hasta que su propia diana transcripcional, PUMA, lo libera y puede así actuar como activador directo de Bax (Chipuk et al. 2004; Chipuk et al. 2005). Otros autores, sin embargo, defienden que p53 actúa como proteína sensibilizadora de manera que tendría el papel de desplazar a Bim de su unión con las proteínas antiapoptóticas Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Han et al. 2010).

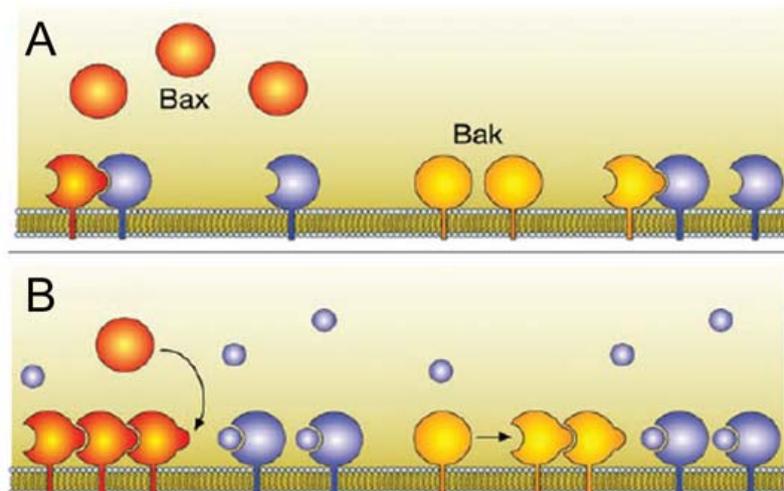
Existen algunos estudios basados en la técnica de inmunoprecipitación que han detectado una interacción directa de Bim con Bax, aunque también sugieren que Bim pueda actuar a su vez uniéndose a proteínas antiapoptóticas siguiendo el modelo indirecto de activación de Bak y Bax (Marani et al. 2002). Otros autores plantean que, así como en ausencia de Bim las moléculas de Bax están neutralizadas por proteínas antiapoptóticas, cuando Bim se encuentra en las células, éste es capaz de unirse a Bax de forma transitoria y activarlo (Merino et al. 2009). También se ha detectado que solamente cuando Bim se encuentra desfosforilado, lo cual se da en ausencia de factores de crecimiento como IL-3, puede interactuar con Bax (Harada et al. 2004).

Resulta interesante el hecho de que aquellas proteínas que se han considerado durante más tiempo como activadoras son capaces de interactuar con todas las proteínas antiapoptóticas, mientras que las que se cree que tienen papel de sensibilizadoras tienen preferencias claras por determinados miembros antiapoptóticos (Figura 2.12). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que todas las proteínas “sólo-BH3” tengan una cierta capacidad de activar a Bak y Bax, y que éste no sea un fenómeno de “todo o nada”, si no que dependiendo del estímulo que desencadene la apoptosis se induzcan unas u otras proteínas “sólo-BH3” y que éstas actúen bien activando a Bax y Bak, bien inactivando a las proteínas antiapoptóticas (Du et al. 2010).



**Figura 2.12 Panel de interacciones entre las proteínas antiapoptóticas y las “sólo-BH3”** (Galan-Malo 2010).

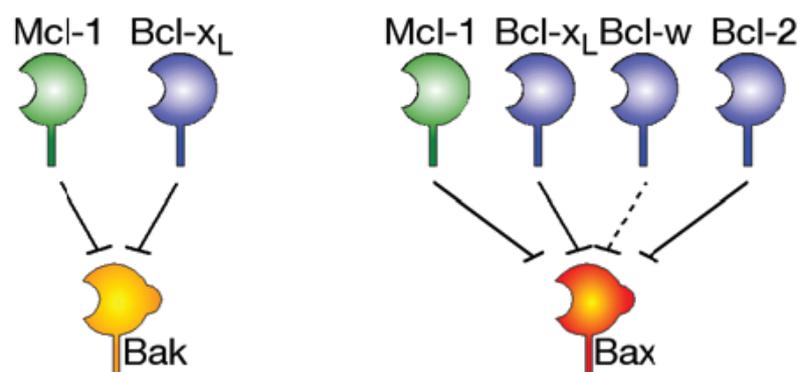
El **modelo indirecto** (Figura 2.13) sugiere que las proteínas antiapoptóticas actúan fundamentalmente neutralizando a Bak y Bax. De esta manera, cuando las proteínas “sólo-BH3” se inducen por diferentes estímulos apoptóticos, éstas van a unirse a las antiapoptóticas liberando así a las moléculas de Bax y Bak que podrán activarse y llevar a cabo la permeabilización de la membrana mitocondrial.



**Figura 2.13 Modelo indirecto de activación de Bax y Bak.** En condiciones normales (**A**), las proteínas antiapoptóticas (esferas azules) se encuentran unidas y neutralizando a las moléculas de Bak activado (esferas amarillas) y de Bax no citosólico (esferas naranjas). Cuando se activa la apoptosis (**B**) las proteínas “sólo-BH3” (esferas azules pequeñas) van a unirse a las proteínas antiapoptóticas, desplazando a Bak y Bax que se activan y oligomerizan para provocar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Modificado de Fletcher y colaboradores (Fletcher and Huang 2008a).

Los autores que defienden este modelo, presentan en sus trabajos datos sobre las interacciones que ocurren entre los miembros antiapoptóticos y las proteínas Bax y Bak (Figura 2.14). Así, según estos trabajos Bak es capaz de interactuar y ser neutralizado por Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>. Estas conclusiones se basan en estudios de inmunoprecipitación y de unión de péptidos *in vitro* (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Otros autores también han detectado la unión de Bak a Mcl-1 (Bae et al. 2000) y Bcl-X<sub>L</sub> (Farrow et al. 1995) mediante ensayos de doble híbrido en levaduras así como de coimmunoprecipitación (Cuconati et al. 2003; Leu et al. 2004) aunque ésta depende de los detergentes empleados en la preparación de los lisados celulares (Germain et al. 2008). Además, se ha descrito que la unión de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> a Bak es imprescindible para proteger de la muerte mediada por Bak (Nijhawan et al. 2003). En cuanto a la proteína Bax los mismos autores defienden que es controlada e inhibida por todos los miembros antiapoptóticos (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Aunque no se ha podido detectar su interacción mediante coimmunoprecipitación con miembros antiapoptóticos de la familia como Mcl-1 (Germain et al. 2008), un estudio anterior empleando ensayo de doble híbrido sugiere que esta interacción pueda existir (Sedlak et al. 1995).

También hay estudios que descartan la activación de Bak y Bax por unión directa de proteínas “sólo-BH3”. Éste es el caso de los trabajos que muestran la activación de Bax mediada por PUMA, pero descartando la unión de ésta a Bax (Marani et al. 2002; Jabbour et al. 2009).



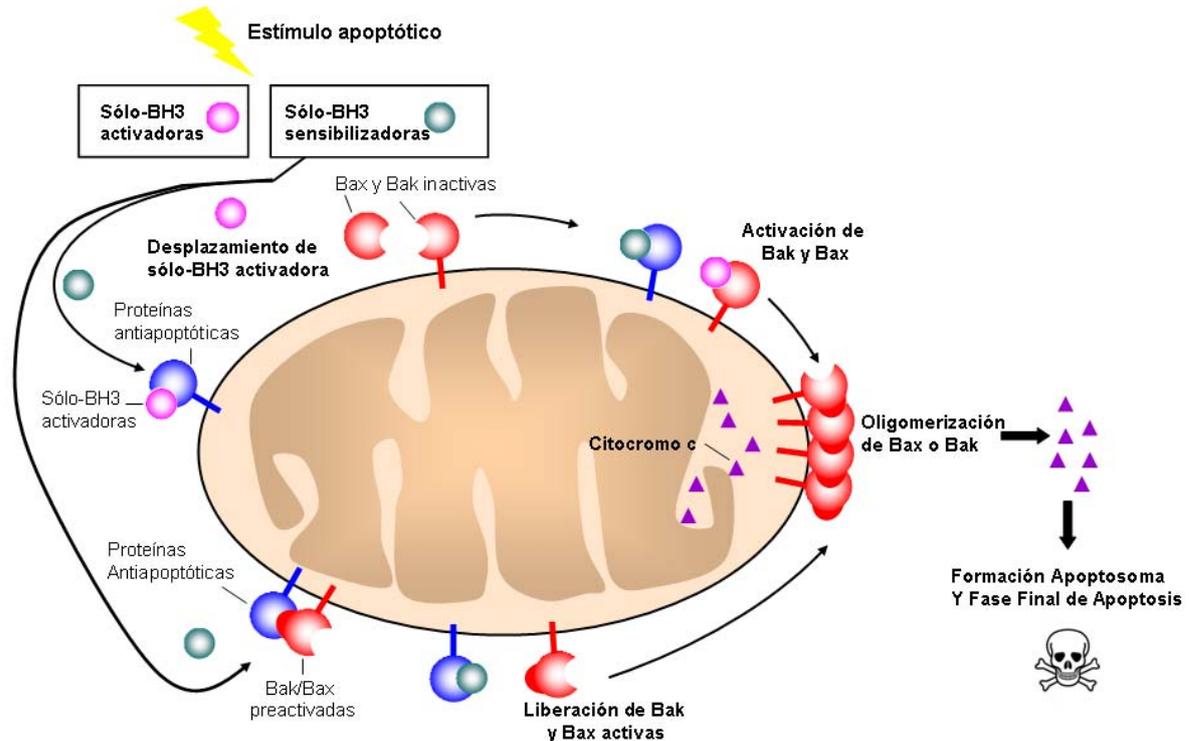
**Figura 2.14** La activación de Bak requiere la neutralización de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>, mientras que para la activación de Bax es necesario que todas las proteínas antiapoptóticas queden neutralizadas por miembros “sólo-BH3” (Fletcher and Huang 2008a).

También destaca la interpretación de las diferentes afinidades de las proteínas “sólo-BH3” por los miembros antiapoptóticos. Así, los autores partidarios del modelo indirecto defienden que las proteínas “sólo-BH3” con mayor capacidad de inducir apoptosis (especialmente Bim y PUMA) son aquellas que pueden neutralizar a todas las proteínas antiapoptóticas; mientras que el hecho de tener un espectro menor de unión (como Bad, Noxa, Baik, Hrk...) condiciona una menor capacidad de provocar muerte (Chen et al. 2005; Uren et al. 2007).

Está clara la controversia que existe en cuanto a la activación de Bax y Bak y existen argumentos en contra de ambos modelos de activación. Así, en contra del modelo directo estaría el hecho de no haberse podido detectar una interacción directa en células intactas entre Bak y las proteínas supuestamente activadoras o que la eliminación de Bim y Bid no evite la apoptosis de las células ante determinados estímulos (Adams and Cory 2007; Willis et al. 2007). Y contra el modelo indirecto destacaría el hecho de que la interacción entre Bax y las proteínas antiapoptóticas sólo haya sido detectada al emplearse detergentes no iónicos que es conocido que cambian la conformación de Bax hacia una conformación activa (Hsu and Youle 1997).

Debido a esta gran controversia y habiendo visto que hay aspectos de ambos modelos que son ciertos (Ott et al. 2009) diversos autores están proponiendo durante estos últimos años un modelo “alternativo” que pretende unificar los dos anteriores según las evidencias a favor de uno y otro (Brunelle and Letai 2009; Dewson and Kluck 2009; Llambi et al. 2011). Este **modelo mixto** (Figura 2.15) contempla la posibilidad de que exista una fracción de Bak y Bax que se encuentren en un estado “pre-activado” en la célula, bien por calor (Pagliari et al. 2005) u otros mecanismos espontáneos no conocidos. Las proteínas antiapoptóticas tendrían, pues, el papel de secuestrar a estas moléculas “pre-activadas” de Bak y Bax así como a las proteínas “sólo-BH3” activadoras. La otra subfamilia de “sólo-BH3” sería capaz de desplazar de las proteínas antiapoptóticas a las activadoras y a las formas activas de Bax y Bak. Finalmente, las proteínas activadoras podrían activar más moléculas de Bak y Bax y también se contempla la posibilidad de que las propias Bak y Bax activas sean capaces de amplificar esta señal de activación (Tan et al. 2006). Además, este modelo también sugiere que Bak y Bax activos se localizan insertados en la membrana mitocondrial externa con una conformación tal que las proteínas antiapoptóticas pueden unirse a ellas y evitar la permeabilización de dicha membrana (Leber et al. 2007; Leber et al. 2010). Ya que este modelo plantea que la mayoría de interacciones ocurren cuando las proteínas están insertadas en membrana, se ha propuesto el nombre de **Embedded Together Model** o **Modelo de Inserción en Membrana** (Leber

et al. 2007; Bogner et al. 2010; Leber et al. 2010) Además, se plantea la posibilidad de que en dependencia del tipo celular, el estímulo apoptótico o la expresión relativa de las proteínas de la familia Bcl-2, predominen más unos tipos de interacciones u otros (Leber et al. 2010).



**Figura 2.15 Modelo mixto de activación de Bak y Bax.** La inducción o activación de proteínas "sólo-BH3" por determinados estímulos apoptóticos libera de su unión con miembros antiapoptóticos a moléculas de Bak y Bax preactivadas y a proteínas "sólo-BH3" activadoras. Las moléculas de proteínas "sólo-BH3" activadoras van a poder activar a más moléculas de Bak y Bax mediante interacción directa con ellas.

#### 2.4.2 Dimerización y oligomerización de Bak/Bax.

Las proteínas Bak y Bax presentan una localización diferente en las células en condiciones normales. Bak está constitutivamente anclada en la membrana mitocondrial externa, para lo cual juega un papel esencial el dominio transmembrana C-terminal de la proteína (Ferrer et al. 2012). Por el contrario, Bax es esencialmente citosólica y se transloca a la mitocondria después activarse por un estímulo apoptótico (Wolter et al. 1997; Goping et al. 1998). Esta localización citosólica se ha observado especialmente en células adherentes epiteliales (Nechushtan et al. 1999; Valentijn et al. 2003). Además, se ha detectado que una fracción de Bax puede estar asociada de

forma ligera a la mitocondria y se puede retranslocar al citosol por su unión a Bcl-X<sub>L</sub> (Edlich et al. 2011).

Para la activación de **Bak**, se ha propuesto recientemente que las proteínas “sólo-BH3” activadoras se unan de forma transitoria al bolsillo hidrofóbico de Bak y activen su oligomerización (Dai et al. 2011). De esta forma, al liberarse la molécula activadora, quedará expuesto el dominio BH3 de Bak y se dará el cambio conformacional en su dominio N-terminal (Griffiths et al. 1999). En relación con esto, Dewson y colaboradores han mostrado en sus trabajos que Bak, al activarse y exponer el dominio BH3 puede interaccionar con el bolsillo hidrofóbico de una segunda molécula de Bak formando un **dímero simétrico** (Dewson et al. 2008) (Figura 2.16 A).

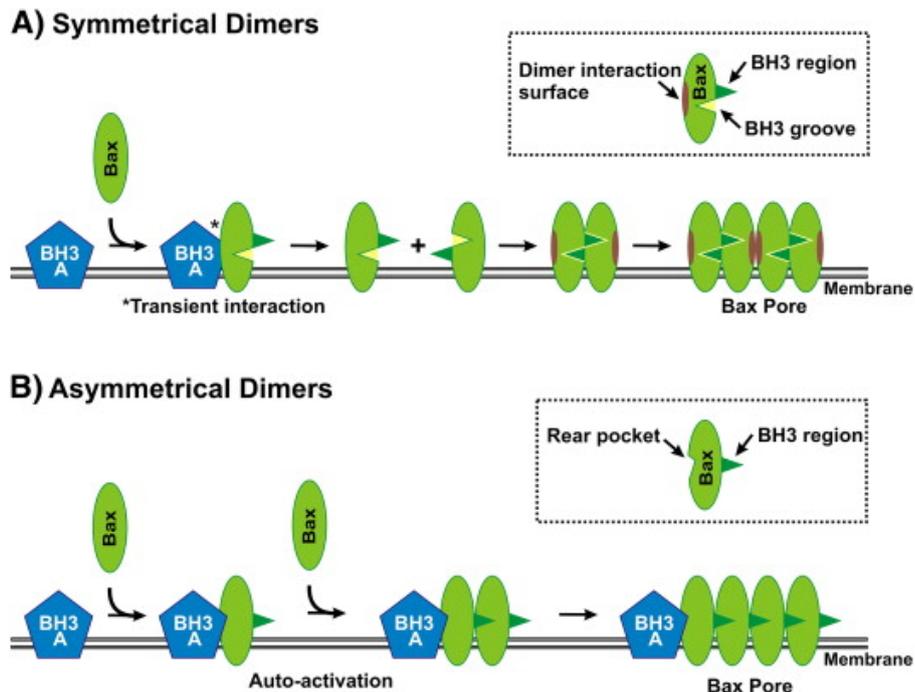
Posteriormente, se ha completado este modelo planteando que se puedan formar oligómeros mediante la interacción entre las hélices  $\alpha$  6 de dos dímeros adyacentes (Dewson et al. 2009b). Los mismos resultados se obtuvieron en otro trabajo empleando liposomas y la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica o EPR (Oh et al. 2010). Además, en este trabajo se rechaza la hipótesis propuesta por otros autores de que en la zona de unión del dominio BH3 y el bolsillo hidrofóbico de dos moléculas de Bak haya un ión Zn<sup>2+</sup> coordinado por aminoácidos de ambos monómeros (Moldoveanu et al. 2006; Wang et al. 2009).

En cuanto a **Bax**, cuando es activada, bien por la unión de proteínas “sólo-BH3” al denominado “bolsillo trasero” formado por las hélices  $\alpha$  1 y 6 (Cartron et al. 2004a; Gavathiotis et al. 2008; Kim et al. 2009), bien por calor (Pagliari et al. 2005; Stankiewicz et al. 2005), cambios de pH (Tafani et al. 2002; Cartron et al. 2004c) u otros activadores, se producen una serie de cambios estructurales antes de su translocación a la mitocondria (Gross et al. 1998; Gavathiotis et al. 2010). Se produce un desplazamiento del bucle que conecta las hélices  $\alpha$  1 y 2 de Bax y se expone el

- 
- 
- 
- 
- Como se revisa en (Lovell et al. 2008; Leber et al. 2010), es posible que la liberación de la hélice 9 de Bax, que no se ha podido detectar mediante estudios de RMN, sea un evento que preceda a la unión de la hélice Bax al bolsillo hidrofóbico formado por los dominios BH1-BH3 de Bax en su dominio BH3 (Nechaj et al. 1999; Souza et al. 2000; Rea et al. 2005). La oligomerización con más moléculas de Bax también es

defendida por otros estudios (Annis et al. 2005; Brustovetsky et al. 2010). Una vez en la mitocondria, Bax activado podría llevar a cabo un proceso de amplificación de la activación de más moléculas de Bax (Tan et al. 2006) independientemente de la señal de translocación que presenta Bax en su extremo C-terminal (Valentijn et al. 2008), uniendo su dominio BH3 expuesto a la zona descrita como sitio de unión de las proteínas “sólo-BH3” (Gavathiotis et al. 2008; Green and Chipuk 2008; Czabotar et al. 2009). Así, se podría formar un oligómero en el que cada molécula de Bax interacciona con las moléculas vecinas mediante dos sitios de contacto diferentes, de acuerdo con un **modelo asimétrico** de oligomerización, formando lo que se ha denominado “daisy chain” de monómeros (Shamas-Din et al. 2010; Zhang et al. 2010; Renault and Manon 2011; Shamas-Din et al. 2011) (Figura 2.16 B).

Sin embargo, recientemente, los mismos autores que describen el **modelo simétrico** de dimerización para Bak, han planteado que la dimerización y oligomerización de Bax ocurra de la misma manera (Westphal et al.; Westphal et al. 2010; Dewson et al. 2012) (Figura 2.16 A). Este tipo de dimerización ya había sido sugerida para Bax en otro trabajo en el que se emplean liposomas y se aplica la técnica de EPR (Bleicken et al. 2010), y apoyaría los datos presentados por George y colaboradores sobre la importancia que tiene la región entre las hélices  $\alpha$  2-5 para la oligomerización de Bax (George et al. 2007). No obstante, como se discute en (Leber et al. 2010), la proximidad de las hélices  $\alpha$  6 en los dímeros tanto de Bak como de Bax, si ambas proteínas oligomerizaran por mecanismos equivalentes, sería energéticamente muy desfavorable y habría una repulsión electrostática importante.



**Figura 2.16. Mecanismos de oligomerización de Bak/Bax en membranas. (A) Dímeros simétricos.** La interacción transitoria de proteínas "sólo-BH3" con Bak/Bax causa la exposición del dominio BH3 de las segundas. Dos moléculas activas de Bak/Bax se unen entonces por introducción del dominio BH3 de cada una en el bolsillo hidrofóbico expuesto de la otra. Los oligómeros se forman por asociación entre dímeros mediante la interacción por una nueva superficie expuesta en las moléculas. **(B) Dímeros asimétricos.** La unión de proteínas "sólo-BH3" activadoras al bolsillo trasero de Bak/Bax provoca la exposición de las regiones BH3, que podrán actuar como activadoras de más moléculas de Bak/Bax mediante autoactivación. En este modelo las proteínas "sólo-BH3" activadoras podrían permanecer unidas a Bak/Bax. (Shamas-Din et al. 2011).

Algunos trabajos también sugieren que Bak y Bax puedan heterodimerizar durante la apoptosis (Sundararajan et al. 2001; Mikhailov et al. 2003), aunque se ha visto que no es necesaria la presencia de ambas moléculas para la ejecución de esta ruta de muerte (Wei et al. 2001). Recientemente se ha propuesto que esta heterodimerización se realice mediante la interacción del dominio BH3 de una de las proteínas y el bolsillo hidrofóbico de la otra (Dewson et al. 2012). Sin embargo, se ha cuestionado la importancia de estos heterodímeros debido a una menor presencia de éstos respecto a homodímeros de Bak o Bax (Dewson et al. 2012).

Todos estos datos ponen de manifiesto la gran controversia que existe en cuanto al mecanismo de activación de Bak y Bax y permeabilización de la membrana mitocondrial. El empleo de metodologías diferentes en los estudios sobre este tema

contribuye a la gran variabilidad de resultados, lo que en muchas ocasiones lleva a una interpretación diferente de éstos.

### **2.4.3 Las proteínas de la familia Bcl-2 como dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.**

Aunque los mecanismos por los que una célula se transforma en tumoral son muy diversos y complejos, se han descrito una serie de características que deben compartir estas células para ser consideradas tumorales (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011):

- Ser autosuficiente en señales de proliferación
- Presentar insensibilidad frente a señales de inhibición del crecimiento.
- Capacidad de evadir la apoptosis.
- Tener un potencial replicativo ilimitado.
- Ser capaz de inducir angiogénesis.
- Tener capacidad de invadir y generar metástasis.

Las células transformadas son capaces de evadir la apoptosis que deberían sufrir mediante modificaciones en proteínas de las dos rutas anteriormente explicadas, extrínseca e intrínseca. La finalidad fisiológica principal de la apoptosis, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, es eliminar del organismo aquellas células que se encuentran dañadas de manera irreversible, que presentan mutaciones potencialmente dañinas, alteraciones en el control del ciclo celular, etc. La desregulación de las rutas de señalización que conducen a la muerte celular rompe el equilibrio entre proliferación y muerte de las células, lo cual está estrechamente relacionado con la aparición de tumores (Ricci and Zong 2006).

Los fármacos empleados en quimioterapia son capaces de inducir la muerte de las células tumorales, pero en la mayoría de casos las células no transformadas también responden a estas drogas, bien bloquean el ciclo celular para poder reparar su DNA o bien terminan muriendo si el daño es muy severo (Ricci and Zong 2006). Por esta razón, las drogas quimioterapéuticas que se están diseñando los últimos años actúan contra dianas específicas, en función del tipo de vías de señalización que se encuentren alteradas en las células tumorales (Fulda et al. 2010). Este tipo de estrategia antitumoral presenta la ventaja de ser altamente selectiva contra las células que están transformadas puesto que son dependientes de esas alteraciones en las

vías de señalización de muerte para su supervivencia. Este tipo de drogas actúan a nivel de dianas muy concretas que, además, son imprescindibles para las células malignas pero no para las sanas. Por ello se espera que el efecto tóxico en las células no malignas del organismo sea mínimo (Grimm and Noteborn 2010).

Respecto a la vía intrínseca, que ha sido la estudiada esencialmente en esta tesis, se han descrito diversas alteraciones en proteínas de esa ruta por las que una célula es capaz de desarrollar resistencia y evadir la apoptosis. Por un lado se ha observado sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2, muy relacionada con resistencia a la quimioterapia (Kirkin et al. 2004); sobreexpresión de proteínas inhibidoras de caspasas así como mutaciones inactivantes en proteínas proapoptóticas (Fesik 2005).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel esencial en la ruta mitocondrial de la apoptosis, por lo no es extraño que en los últimos años se hayan convertido en dianas terapéuticas importantes para el tratamiento del cáncer (Marzo and Naval 2008; Frenzel et al. 2009).

Una de las estrategias es el uso de moléculas miméticas dominios BH3 en forma de péptidos derivados en proteínas "sólo-BH3" como Bid (péptido BID-SAHB) (Walensky et al. 2004) o bien compuestos orgánicos que se unen al bolsillo hidrofóbico de las proteínas antiapoptóticas como lo harían las proteínas "sólo-BH3". Dentro de estas moléculas destaca ABT-737 (desarrollado por Abbot Laboratories, USA) capaz de inhibir específicamente a Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 y Bcl-w (Chen et al. 2007b) u Obatoclax (desarrollado por Gemin X Biotechnologies, Canada) que inhibe a todas las proteínas antiapoptóticas. Otro tipo de moléculas con capacidad antitumoral se han encontrado en productos naturales como Gossypol, un derivado de la planta del algodón o la Cheleryrhina, alcaloide natural, ligando de Bcl-X<sub>L</sub> capaz de inducir muerte incluso en células deficientes en Bak y Bax (Marzo and Naval 2008). Estudios preclínicos con estas moléculas han mostrado su prometedora actividad citotóxica, administrándose solos o en combinación con otros agentes antineoplásicos. En la actualidad algunas de estas moléculas se están evaluando en ensayos clínicos en Fase I y II contra tumores sólidos o hematológicos (Ghiotto et al. 2010).

Existe otro tipo de terapias basadas en RNAi o antisentido, de manera que se impide o reduce la expresión de ciertas proteínas. Así, destaca Genasense, oligodeoxirribonucleótido cuya diana es el codón de iniciación del RNA mensajero de Bcl-2; OGX-011, oligonucleótido antisentido que impide que se exprese la proteína clusterina (molécula inhibidora de Bax); el oligonucleótido 4625, capaz de reducir la

expresión tanto de Bcl-2 como de Bcl-X<sub>L</sub> e ISIS 20408, que actúa sobre Mcl-1 (Marzo and Naval 2008).

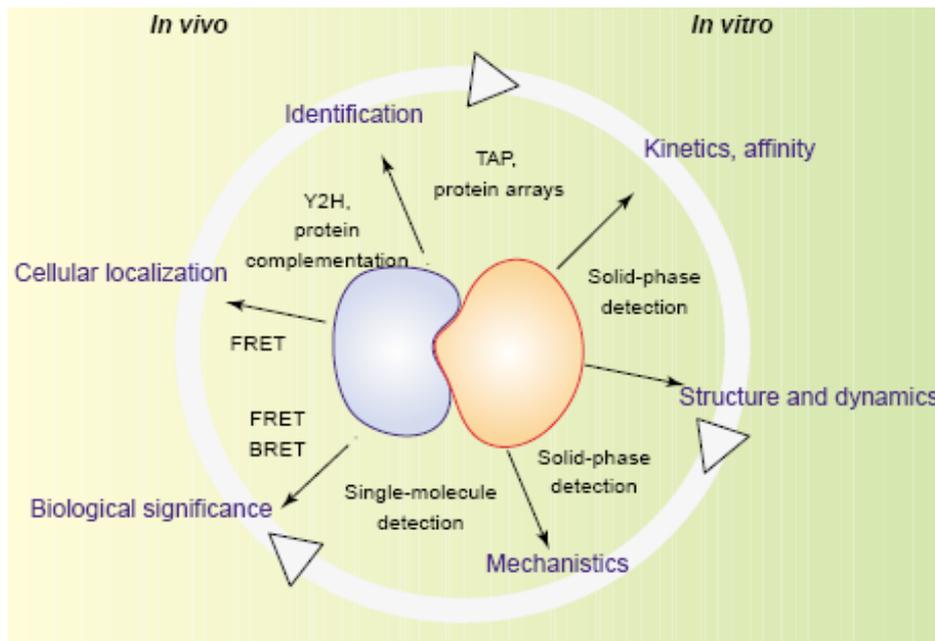
## 2.5 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS.

Los avances durante la última década en la secuenciación de diferentes genomas han permitido obtener valiosa información acerca de las proteínas codificadas en los diferentes genes. A partir de esa información, muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en estudiar las funciones y propiedades de estas proteínas (Piehler 2005).

Las proteínas tienen funciones esenciales en la célula, y las interacciones proteína-proteína (IPP) son fundamentales para muchos procesos biológicos, desde la formación de estructuras celulares y complejos enzimáticos hasta la regulación de vías de señalización celular (Lalonde et al. 2008). Por ello, se ha planteado que descifrar las redes de interacciones entre proteínas, **interactomas**, es imprescindible para entender todos esos procesos a nivel molecular y biofísico.

Las interacciones entre proteínas se caracterizan por parámetros cinéticos y termodinámicos, de manera que pueden establecerse interacciones estables o bien transitorias que requieren de una menor afinidad de unión y que, en general, juegan un papel regulador (Lalonde et al. 2008). Se han desarrollado diferentes metodologías para estudiar las interacciones entre proteínas desde varias perspectivas (Figura 2.17), tanto *in vitro* como *in vivo*, cada una de las cuales presenta ciertas ventajas y desventajas en cuanto a la aplicabilidad, sensibilidad y exactitud (Edwards et al. 2009).

Se ha demostrado que las superficies de unión entre proteínas difieren significativamente en la composición de aminoácidos respecto a otras zonas de la proteína y se les ha denominado "**hot spots**". Además, disponer de información estructural es en muchos casos esencial para desarrollar técnicas que determinen de forma precisa interacciones entre proteínas (Shoemaker and Panchenko 2007).



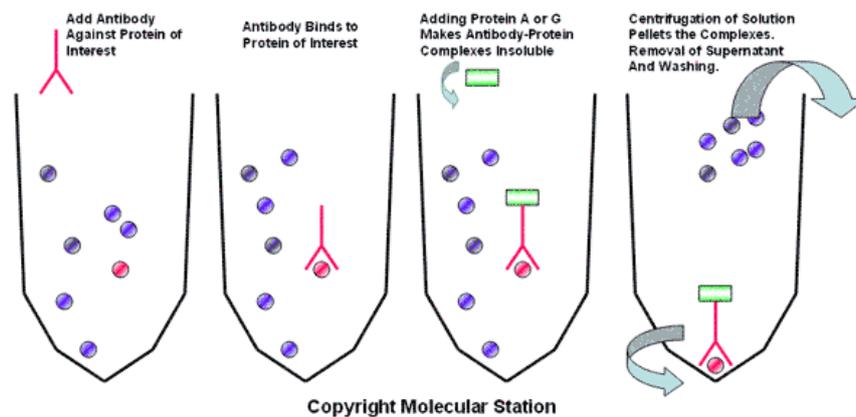
**Figura 2.17 Diferentes técnicas para la caracterización de interacciones entre proteínas *in vivo* e *in vitro*.** Las interacciones entre proteínas se pueden estudiar desde diferentes perspectivas. Es necesario caracterizar en detalle las propiedades moleculares y biofísicas de los complejos formados (estequiometría de los complejos, afinidades por diferentes parejas, constantes cinéticas o sitios de interacción). No obstante, se debe tener muy en cuenta también el ambiente celular en que estas interacciones ocurren, para lo que son imprescindibles las técnicas aplicadas *in vivo* (Piehler 2005).

## 2.5.1 Métodos bioquímicos para estudiar interacciones entre proteínas.

### 2.5.1.1 Coimmunoprecipitación.

Una de las técnicas bioquímicas más ampliamente utilizada para estudiar interacciones entre proteínas *in vitro* ha sido la **inmunoprecipitación**. Esta técnica consisten en enriquecer una fracción de un lisado celular en una o varias proteínas mediante la unión de un anticuerpo específico contra ella y precipitar el complejo anticuerpo-proteína (Figura 2.18). La precipitación de este complejo se realiza mediante el uso de Proteína G o A (que se unen a la región Fc de las IgG) o de un anticuerpo secundario asociado a bolitas de agarosa que se dirige contra la región Fc del anticuerpo primario usado para inmunoprecipitar. Una de las principales dificultades que presenta este método es la elección del detergente para preparar los lisados celulares. Algunos detergentes, como Tritón X-100, son capaces de inducir interacciones no fisiológicas dando lugar a resultados “falsos positivos”. Además, estos

detergentes se ha comprobado que inducen un cambio conformacional en algunas proteínas (Hsu and Youle 1997; Germain et al. 2008), por lo que las interacciones detectadas por esa técnica serían “artefactuales” en esas condiciones. Por el contrario, existen otros detergentes que no son capaces de extraer de manera eficiente las proteínas asociadas a las membranas por lo que su uso podría suponer una infravaloración de las interacciones detectadas. Otro problema habitual es la disponibilidad de buenos anticuerpos que inmunoprecipiten las proteínas de interés específicamente (Miernyk and Thelen 2008).



**Figura 2.18 Protocolo general de la inmunoprecipitación de proteínas.** En primer lugar se añade un anticuerpo dirigido contra una proteína de interés a un lisado celular. La adición de proteína A o G hace que los complejos proteína-anticuerpo se vuelvan insolubles y la centrifugación del lisado precipita dichos complejos que pueden ser lavado y purificados. (Molecular Station).

Este tipo de técnicas bioquímicas basadas en la purificación de proteínas por afinidad se han mejorado al acoplarles una técnica proteómica que permita identificar los componentes del complejo precipitado. Para ello, las proteínas se expresan acoplándoles en fase una etiqueta o “tag” que sirve de epítipo para después, por afinidad, purificar esa proteína y las posibles proteínas que interaccionan con ella (Piehler 2005). A continuación, los complejos de proteínas se analizan por electroforesis y a las proteínas individuales se las somete a proteólisis para el posterior análisis de los péptidos por **espectrometría de masas**. Los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas son ionizados en fase gas, bien por ionización por electrospray (ESI) o deserción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). La identificación de los péptidos se hace en base a la relación masa/carga (Causier 2004). Esta técnica presenta la desventaja de que las interacciones transitorias entre

proteínas no pueden ser identificados debido a los procesos de purificación a los que se somete a los complejos (Gingras et al. 2007).

Otra técnica que se ha acoplado a la inmunoprecipitación es el “**crosslinking**” **químico** de proteínas. Consiste en utilizar agentes químicos capaces de reaccionar con grupos reactivos de proteínas de manera que se estabilizan las interacciones de las proteínas permitiendo la posterior purificación y análisis por espectrometría de masas del complejo sin que éste sea destruido en el procedimiento de purificación (Miernyk and Thelen 2008).

#### **2.5.1.2 Cristalografía de Rayos X.**

Otra técnica muy empleada para determinar la estructura de proteínas y de complejos proteicos ha sido la **cristalografía de rayos X**. De forma breve, esta técnica consiste en bombardear el complejo proteico con rayos X e integrar los patrones de difracción obtenidos de manera que se reconstituye la estructura tridimensional del complejo. Esta técnica es capaz de resolver la estructura a nivel atómico por lo que se obtiene información muy detallada de los átomos involucrados en las interacciones.

#### **2.5.1.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

La **espectroscopía de RMN** también provee resolución atómica, extrayendo las distancias entre los átomos mediante la medida de las transiciones entre diferentes estados de spin nuclear en un campo magnético. Se ha empleado para identificar los residuos involucrados en determinadas interacciones entre proteínas, aunque generalmente la aplicación de esta técnica está limitada a proteínas de alrededor de 300 residuos.

#### **2.5.1.4 Resonancia de plasma superficial.**

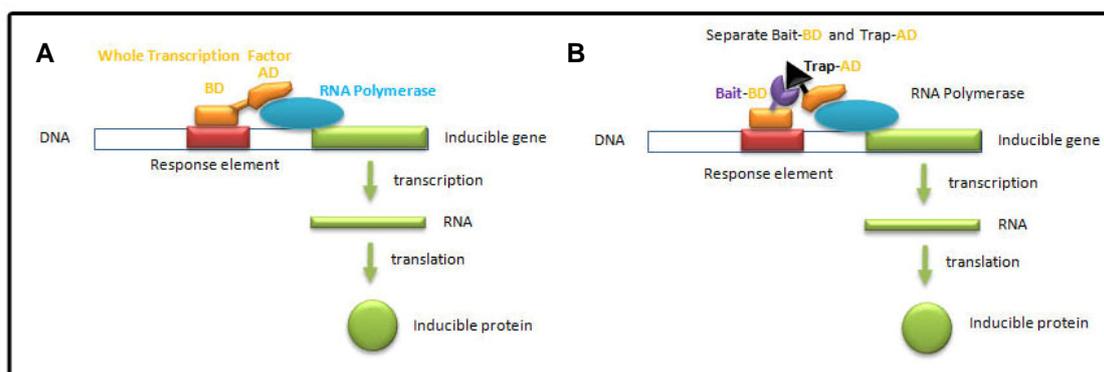
También se ha aplicado la técnica de **resonancia de plasma superficial (SPR)**, una técnica en fase sólida, que permite detectar la interacción de un ligando soluble con un receptor inmovilizado en una superficie metálica transductora, o “biosensor”. La unión de un ligando provoca cambios en el índice de refracción de la luz por la superficie metálica, que será proporcional a la masa de ligando unida; por lo que este método permite estudiar las cinéticas de equilibrio e interacción (Piehler 2005).

### 2.5.1.5 “Arrays” de proteínas.

Otro tipo de estrategia utilizada para estudiar interacciones entre proteínas han sido los “arrays” o **chips de proteínas**. Esta técnica requiere la inmovilización de proteínas en un soporte de vidrio o membrana de nitrocelulosa u otro material. La inmovilización se suele llevar a cabo por procesos de adsorción, “cross-linking”, etc, siendo uno de los aspectos más problemáticos el mantenimiento de la conformación nativa de las proteínas. La lectura de estos chips es generalmente indirecta, mediante el uso de sondas fluorescentes.

### 2.5.1.6 Doble híbrido en levadura.

La técnica de **doble híbrido en levadura** (Y2H) ha supuesto un avance importante para la detección de interacciones entre proteínas. Se basa en el hecho de que muchos factores de transcripción eucariotas tienen un dominio de unión a una secuencia promotora de DNA (BD) y otro que activa la transcripción (AD). Así, cada una de las proteínas a estudiar se fusiona a uno de los dominios y se coexpresan ambas en levaduras, de manera que si esas proteínas interactúan se reconstituye el factor de transcripción en el núcleo y se activa la transcripción de genes marcadores (Lalonde et al. 2008). El primer sistema de doble híbrido se desarrolló en 1989 (Fields and Song 1989). Típicamente una proteína de interés se fusiona al dominio BD y se analiza frente a una librería de proteínas fusionadas con el AD para hacer un “screening” de parejas de interacción.



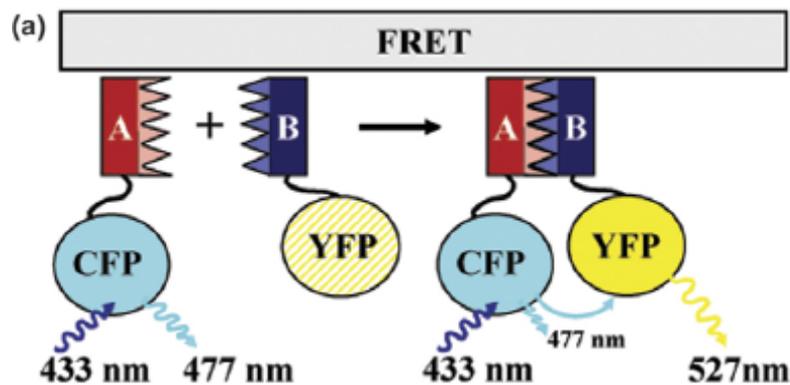
**Figura 2.19 Doble híbrido en levadura. A.** Funcionamiento normal de muchos factores de transcripción eucariotas. **B.** Las proteínas de interés se fusionan a cada dominio de un factor de transcripción, BD o AD. La interacción entre las proteínas fusionadas cuando se expresan en levaduras activa la transcripción de genes marcadores.

## **2.5.2 Métodos basados en fluorescencia para la detección de interacciones entre proteínas.**

Ninguna de las técnicas anteriormente explicadas aporta información acerca de las interacciones entre proteínas en su ambiente nativo. Para ello, se han desarrollado nuevas técnicas que aplican la tecnología de imagen acoplada al uso de proteínas fluorescentes genéticamente modificadas y que permite identificar interacciones entre proteínas *ex vivo*.

### **2.5.2.1 Técnicas basadas en la Transferencia de Energía de Resonancia.**

El fenómeno por el que hay una transmisión de energía de un dador a un aceptor por acoplamiento dipolo-dipolo (resonancia) fue descrito por Förster el año 1948 (Förster 1948). La aplicación de este fenómeno al estudio de interacciones entre proteínas se denomina **FRET** (Fluorescence Resonance Energy Transfer) y consiste en la fusión de proteínas fluorescentes a dos proteínas cuya interacción se quiere estudiar. Es necesario que el espectro de emisión de una de las proteínas fluorescentes tenga un cierto solapamiento con el espectro de excitación de la segunda proteína fluorescente. De esta manera, y si las proteínas a estudiar interaccionan se encuentran lo suficientemente cerca ( $\sim 60\text{\AA}$ ), cuando se excite el primer fluoróforo habrá una transferencia de parte de la energía al segundo y se detectará la fluorescencia emitida por la segunda proteína fluorescente. Habitualmente se emplean proteínas fluorescentes derivadas de la proteína fluorescente verde (GFP), como son la proteína fluorescente cyan (CFP) y la amarilla (YFP) (Tsien 1998). Mediante esta técnica se ha identificado la unión entre numerosas proteínas entre ellas dos proteínas de la familia Bcl-2, objeto de estudio de este trabajo, como Bax y Bcl-2 (Mahajan et al. 1998). La eficiencia de esta técnica depende de que la orientación de los dipolos del dador y aceptor sea la correcta (Xu et al. 2003).



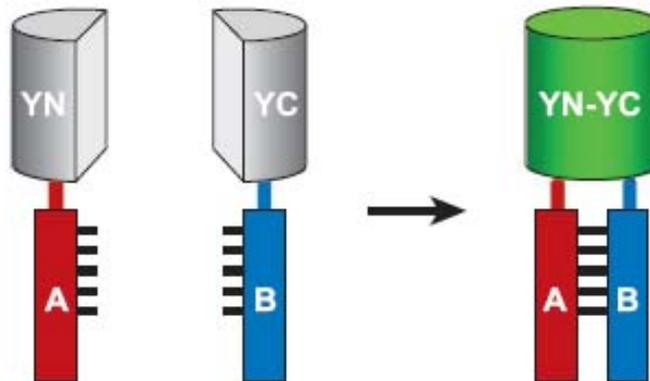
**Fig 2.20. Representación esquemática de la técnica FRET.** Se muestran dos proteínas (A y B) fusionadas a un fluoróforo donador (CFP) o un aceptor (YFP). Cuando las proteínas A y B interactúan, los fluoróforos se encuentran a la suficiente proximidad (< 100 nm) como para que ocurra una transferencia de energía desde el donador al aceptor después de que el primero haya sido excitado (Ciruela 2008).

### 2.5.2.2 Métodos basados en la complementación de dos fragmentos de una proteína (PCA).

Esta técnica consiste en fragmentar el cDNA que codifica una proteína determinada en dos y cada uno de los fragmentos resultantes se fusiona al cDNA de una de las proteínas cuya interacción se quiere estudiar. Se han empleado diferentes proteínas para estos ensayos de complementación; desde enzimas como la dihidrofolato reductasa,  $\beta$ -lactamasa,  $\beta$ -galactosidasa o luciferasa, hasta proteínas fluorescentes (Morell et al. 2009). El método de detección de la complementación de los dos fragmentos y reconstitución de la proteína completa difiere en cada caso. El empleo de proteínas fluorescentes ofrece la ventaja de poder visualizar el complejo formado directamente en células vivas sin necesidad de tinciones ni de moléculas exógenas (Kerppola 2006b). En el caso específico de utilizarse proteínas fluorescentes, la técnica de complementación se denomina **BiFC** (del inglés, Bimolecular Fluorescence Complementation).

### 2.5.2.3 BiFC (Complementación Bimolecular Fluorescente).

Se basa en la formación de un complejo fluorescente cuando dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente son unidos en el espacio por una interacción entre las proteínas A y B a las que los fragmentos están fusionados.



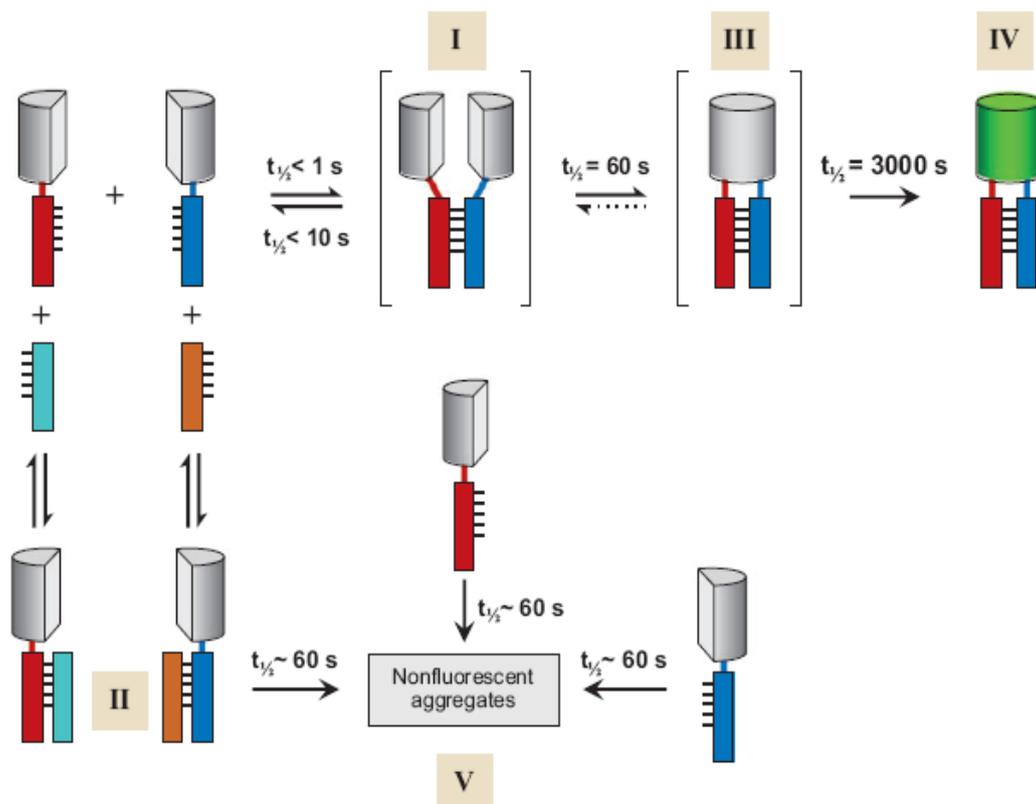
**Figura 2.21** Esquema representativo de la formación de complejos por BiFC (Kerppola 2008).

Una de las principales **ventajas** de la técnica BiFC es la visualización directa de los complejos formados en células vivas. Además, esta técnica permite detectar interacciones débiles o transitorias puesto que la señal fluorescente que se genera es estable. Esta es una de las limitaciones de la mayoría de técnicas empleadas en interactómica y supone un gran avance ya que la mayoría de las interacciones entre proteínas en la célula son de esta naturaleza. Otra ventaja es que se puede detectar la formación de complejos aunque solamente se dé la interacción entre una fracción de unión de ésta a Bax □ ADDIN EN.CITE □ ADDIN EN.CITE.DATA □□□(Marani et al. 2002a) (Kerppola 2006b).

Sin embargo, también existen importantes **limitaciones** para esta técnica. Una de estas limitaciones es que la formación del fluoróforo requiere de un cierto tiempo, por lo que no se podrían detectar cambios rápidos en las interacciones (Kerppola 2006b). Además, parece ser que cuando los fragmentos de la proteína fluorescente se reensamblan de manera no covalente, lo hacen formando un complejo bimolecular irreversible (Kerppola 2008). No obstante, algunos trabajos sugieren que exista cierta reversibilidad en la formación de estos complejos y que se puedan estudiar algunas interacciones dinámicas (Schmidt et al. 2003; Guo et al. 2005). En cuanto a esto, es difícil descartar que estén interviniendo procesos de degradación de proteínas que afecten a la señal que se detecta en células vivas, y hasta el momento no se ha

podido demostrar la disociación de las proteínas de fusión (Kerppola 2008). La formación de complejos por BiFC ocurre de manera eficiente en ausencia de inductores. Esto puede ser un reflejo de interacciones débiles entre proteínas que se dan independientemente de la presencia de moléculas o señales inductoras (Robida and Kerppola 2009).

Mediante estudios *in vitro* con proteínas purificadas se ha podido estudiar la dinámica de formación de los complejos por BiFC (Hu et al. 2002). El primer paso es la interacción entre las proteínas que están fusionadas a los fragmentos de la proteína fluorescente (Complejo I), lo cual se da en competición con las parejas endógenas alternativas presentes en la célula (Complejos II) (Fig. 2.22). La asociación entre los fragmentos fluorescentes es más lenta y produce un intermediario de plegamiento (Complejo III), que tras la maduración termina generando el fluoróforo (Complejo IV). Los complejos no fluorescentes formados con proteínas endógenas y las proteínas de fusión que no se han asociado con otros fragmentos complementarios forman agregados *in vitro* cuyo destino final no se conoce exactamente (Kerppola 2006b).



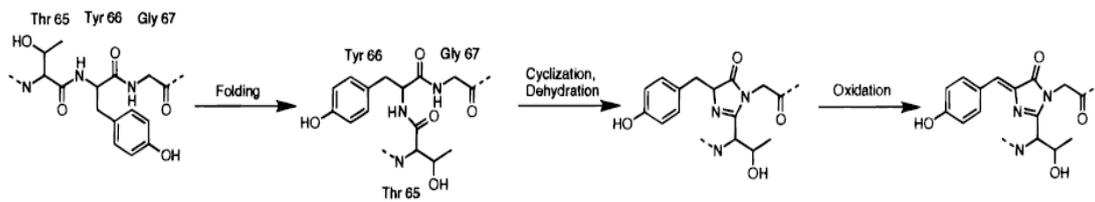
**Figura 2.22. Mecanismo para la formación de los complejos bimoleculares fluorescentes** (Kerppola 2006b).

La técnica BiFC se ha aplicado al estudio de interacciones entre muchos tipos de proteínas (ver Tabla 2.1) y en diversos organismos como células de mamífero, plantas, levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Morell et al. 2008).

<b>Categoría</b>	<b>Características</b>	<b>Organismo</b>
<b>Péptidos</b>	Proteínas de choque térmico	<i>E. coli</i>
<b>Proteínas Nucleares</b>	Dominio bZIP, Familia Rel, Familia SMAD	Células Mamífero
<b>Familia Ubiquitina</b>	Complejos E3-ligasa_sustrato	Células Mamífero, <i>S. cerevisiae</i> , <i>Sinapsis alba</i>
<b>Proteínas de Señalización</b>	Ruta MAPK, fosfolipasas, reguladores de apoptosis, Proteínas G heterotriméricas	
<b>Complejos Enzimáticos</b>	Citocromo P450	Células Mamífero, <i>E. coli</i>
<b>Proteínas de Membrana</b>	Señalización de integrinas, lectinas, receptores de citoquinas	Células Mamífero
<b>Proteínas de unión a ácidos nucleicos</b>	Proteínas de unión a RNA y a DNA	Células Mamífero, <i>in vitro</i>
<b>Proteínas de Plantas</b>	Factores de transcripción, proteínas reguladoras de la floración y división de plastidios	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>Patógenos de Plantas</b>	Secreción Tipo IV, interacciones hospedador-patógeno	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>N. Tabacum</i>

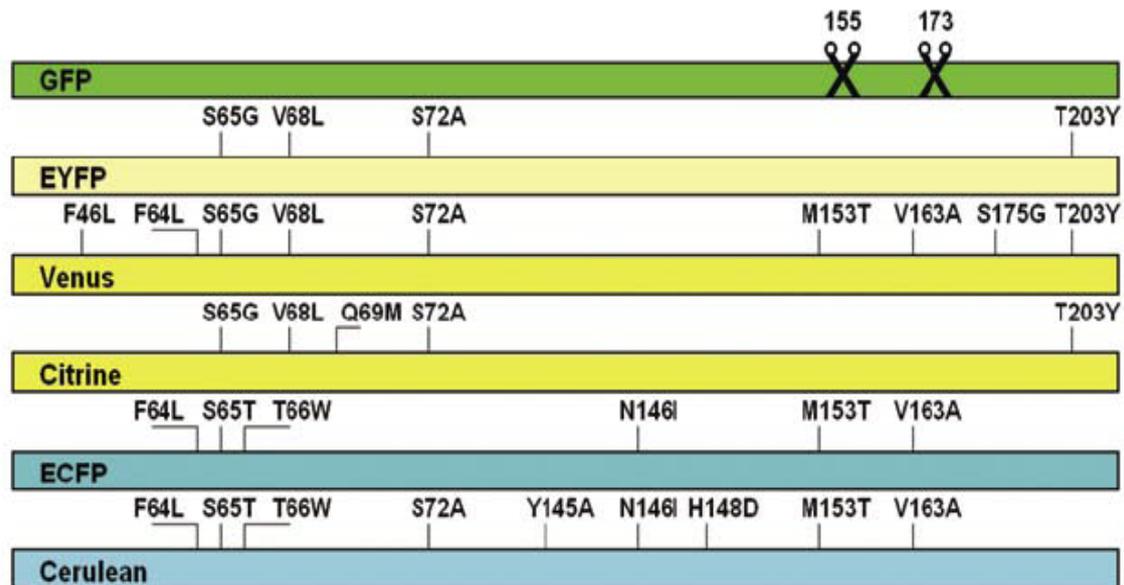
**Tabla 2.1 Ejemplos de las interacciones entre proteínas estudiadas mediante Complementación Bimolecular Fluorescente.** Modificado de (Kerppola 2006b).

Se han empleado hasta 10 proteínas fluorescentes diferentes con capacidad de complementar los dos fragmentos generados (Shyu and Hu 2008), cubriendo así gran parte del espectro de fluorescencia. Además, se han estudiado diferentes posiciones donde fragmentar cada proteína (Shyu et al. 2006; Shyu and Hu 2008). Cabe destacar que la fragmentación de estas proteínas se ha diseñado de manera que los aminoácidos implicados en la formación del cromóforo queden en el fragmento amino de la proteína. Para la proteína fluorescente verde, GFP, estos residuos son la treonina 65, la tirosina 66 y la glicina 67 (Heim et al. 1994). Este tripéptido sufre una ciclación, deshidratación y posterior oxidación para dar lugar al cromóforo (Reid and Flynn 1997), de tal manera que para que ocurran estas reacciones en la proteína fragmentada es necesario que se dé la complementación de los dos fragmentos.



**Figura 2.23 Modelo para la formación del cromóforo de la proteína GFP según lo propuesto por Heim y colaboradores (Heim et al. 1994).** El tripéptido del cromóforo está representado en una conformación extendida en el estado desnaturalizado (Reid and Flynn 1997).

Una vez se han complementado los dos fragmentos de la proteína fluorescente, la formación del cromóforo requiere de un cierto tiempo, lo cual supone una limitación como se ha mencionado anteriormente (Kerppola 2006b). Además, algunas de las proteínas empleadas para BiFC, como la EYFP, tienen el inconveniente añadido de que la maduración del fluoróforo es sensible a la temperatura, y se ralentiza a 37°C, temperatura a la cual crecen los cultivos celulares empleados normalmente para estos estudios (Shyu and Hu 2008). También la mRFP, cuyo empleo en la complementación de fluorescencia se ha investigado relativamente recientemente, se ha visto que necesita de un tiempo a 30°C para completar la maduración del fluoróforo. A partir de la GFP se han desarrollado, por modificación genética de diversos residuos, diferentes variantes de proteínas fluorescentes que se pueden emplear para la técnica de BiFC (Shyu et al. 2006) (Figura 2.24).



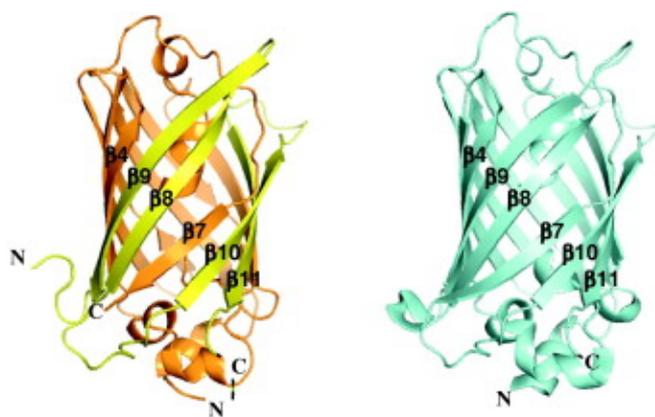
**Figura 2.24 Variantes de proteínas fluorescentes empleadas en ensayos de BiFC.** Los residuos indicados corresponden a sustituciones a partir de la GFP, y los símbolos de tijeras a las posiciones de corte para generar los fragmentos empleados para BiFC (Shyu et al. 2006).

Cada proteína fluorescente tiene unos sitios de fragmentación que se ha visto que le permite complementarse bien y con una reconstitución espontánea mínima. La estructura en barril  $\beta$  que rodea al fluoróforo en este tipo de proteínas está formada por tres segmentos contiguos de secuencias peptídicas, cada uno de los cuales forma una lámina  $\beta$  antiparalela que, en conjunto, forman este barril  $\beta$  (Ormo et al. 1996). De esta manera, se ha podido determinar que los fragmentos que permiten la complementación contienen una lámina  $\beta$  incompleta, mientras que aquellos que se generan en los puntos unión entre las diferentes láminas no exhiben esta complementación de fluorescencia (Hu et al. 2002; Hu and Kerppola 2003).

La variante denominada Venus ha sido muy utilizada durante los últimos años para estudios de BiFC, y ha sido la empleada para este trabajo. Esta proteína fluorescente, originada a partir de la proteína fluorescente amarilla (YFP), presenta varias mutaciones que le confieren ciertas ventajas frente a otras proteínas (Nagai et al. 2002). La introducción de la mutación F46L permite a esta proteína que su cromóforo pueda madurar más rápidamente y que lo haga a 37°C, de manera que la detección de los complejos de BiFC en experimentos con cultivos de células ya no están condicionados por la temperatura (Rekas et al. 2002). También parece que las mutaciones F64L, M153T, V163A y S175G favorecen el plegamiento de la proteína

para la formación del cromóforo (Shyu et al. 2006). Además, la proteína Venus presenta una menor sensibilidad a cambios de pH y de concentración de iones (Nagai et al. 2002) y mayor intensidad de fluorescencia al complementar los dos fragmentos (Shyu et al. 2006). Sin embargo, también se ha detectado que, al expresarse a niveles altos, disminuye la especificidad de los complejos formados y aumenta la complementación espontánea de los fragmentos N- y C-terminal de Venus (Kodama and Hu 2010), y se están investigando algunas mutaciones que sean capaces de disminuir esta complementación inespecífica (Nakagawa et al. 2011).

Hasta hace relativamente poco tiempo no se había podido determinar la estructura y las características de la proteína fluorescente Venus tras la complementación de los dos fragmentos N- y C- terminal. Isogai y colaboradores han podido describir esta estructura mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 2.1 Å (Isogai et al. 2011), habiendo determinado que tiene la estructura de 11 láminas  $\beta$  plegadas en un barril  $\beta$  típica de la proteínas derivadas de la GFP. Los espectros de fluorescencia que han podido obtener son idénticos a los de la proteína Venus completa. Además, se ha descrito que los fragmentos separados de la proteína, bien N- o C-terminal, no presentan absorción de fluorescencia hasta que éstos se asocian en la conformación de barril- $\beta$  característica de esta proteína (Kent et al. 2008).

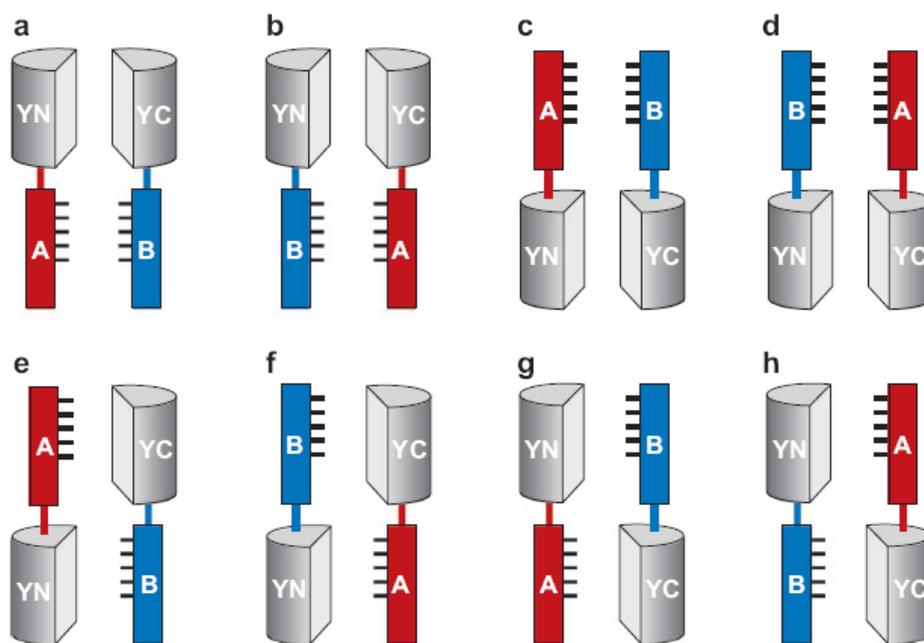


**Fig 2.25 Comparación de la estructura de Venus complementada (amarillo y naranja) y de la proteína entera nativa (azul) (Isogai et al. 2011).**

### 2.5.2.3.1 Procedimiento general para los ensayos de BiFC

El primer paso para plantear los experimentos de BiFC para estudiar interacciones entre proteínas es **diseñar las proteínas de fusión** que se van a emplear.

- Por un lado se debe escoger los **vectores** con los que se va a trabajar dependiendo de las necesidades y determinar la **posición de las proteínas de fusión**. Una ventaja de la técnica BiFC es que no se requiere información estructural previa acerca de las proteínas cuya interacción se desea estudiar. Sin embargo, esto implica que sea necesario en algunos casos probar de manera empírica diferentes combinaciones de proteínas de fusión (Fig. 2.26). Estos constructos deben diseñarse de manera que se minimicen las restricciones estéricas y se permita la asociación de las proteínas de fusión. Hay que tener en cuenta que estas fusiones no afecten ni a la localización ni a la función de la proteína respecto a la forma silvestre (Kerppola 2006).



**Figura 2.26. Diferentes combinaciones de las proteínas de fusión para ensayos de BiFC.** Aunque pueda parecer que las combinaciones e-h serían desfavorables para la formación de los complejos, esto depende de la estructura precisa y la flexibilidad de las proteínas de fusión, lo cual es difícil de predecir (Kerppola 2006).

- El siguiente punto a considerar es la elección de la **secuencia espaciadora o “linker”** que se coloca entre las dos partes de la proteína de fusión. La función de esta secuencia es aportar la flexibilidad necesaria para el movimiento

independiente de ambas partes y que los fragmentos de la proteína fluorescente se complementen si las proteínas a las que están fusionados interactúan entre ellas. Algunas secuencias comúnmente utilizadas como linkers en los vectores de BiFC son las correspondientes a los aminoácidos RSIAT y RPACKIPNDLKQKVMNH (Hu et al. 2002). Se han estudiado los aminoácidos que mejor funcionan en las secuencias espaciadoras habiéndose determinado que treonina, serina, prolina, ácido aspártico, glicina, lisina, glutamina, asparragina y alanina son los mejores candidatos en este orden (Argos 1990).

A continuación se debe elegir el **sistema de expresión** de estas proteínas de fusión y la estrategia para expresarlas. Las células que crecen en monocapa adherentes son generalmente más fáciles de transfectar y de aplicar microscopía de fluorescencia para detectar los complejos. Se suele realizar una **transfección transitoria** de los vectores para determinar si una pareja de proteínas interactúa y determinar la localización subcelular de los complejos formados. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la expresión de estas proteínas de fusión sea a niveles similares a las proteínas endógenas, para lo que se recomienda transfectar pequeñas cantidades de vectores y analizar los complejos formados poco después de la transfección. Así, se minimizarían las interacciones inespecíficas y la localización errónea de los complejos (Kerppola 2006). Otra estrategia sería realizar una **expresión estable** en las líneas celulares, de manera que se conseguirían niveles de expresión más controlados y reproducibles, independientemente de la eficiencia de transfección.

Otro aspecto muy importante a considerar durante los experimentos de BiFC es el diseño de **controles negativos** que permitan determinar la especificidad de las interacciones visualizadas. En este punto juega un papel esencial el disponer de datos estructurales en los que basarse para generar estos controles. Si se conoce la zona de unión de las proteínas, se pueden realizar mutaciones en ésta y comparar los niveles de fluorescencia conseguidos. En caso de no conocer la zona de interacción de las proteínas, es posible hacer un rastreo de mutaciones que alteren la complementación de las dos proteínas de fusión. En todo caso, es necesario comprobar los niveles de expresión de estas proteínas mutadas mediante western-blotting (Kerppola 2006).

Para cuantificar la eficiencia de esta técnica se suele incluir un control interno en los experimentos para normalizar las diferencias de eficiencias de transfección y expresión de proteínas en células individuales. Para ello, las células se co-transfectan con los vectores que codifican las proteínas de fusión y un tercer vector que codifica

una proteína fluorescente completa con características espectrales diferentes a la empleada para la complementación. Así, se suele realizar el cálculo de las intensidades de fluorescencia del BiFC respecto a la intensidad de fluorescencia de la proteína intacta, habiendo siempre restado la señal de fondo inespecífica. De esta manera, la comparación de estas ratios entre proteínas silvestres y mutadas, permite determinar si las interacciones que se están detectando son o no específicas.

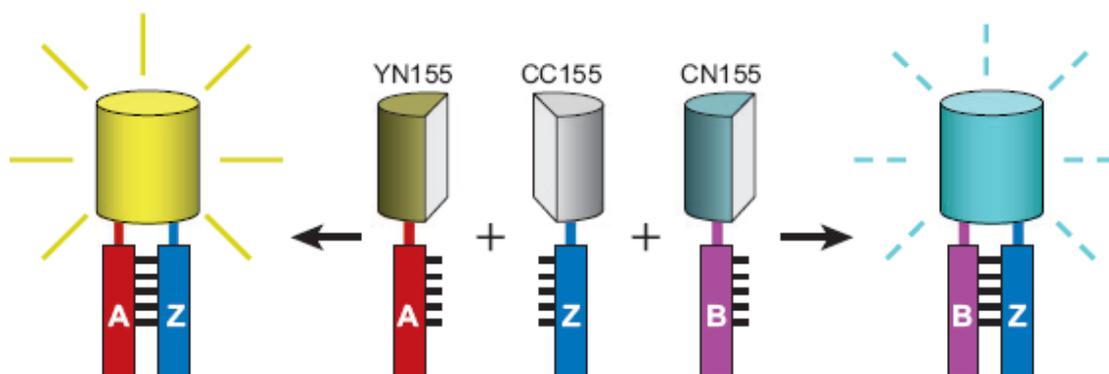
Una consideración importante a la hora de interpretar los resultados de los experimentos de BiFC, es que la ausencia de señal fluorescente no es una prueba de que la interacción que se pretende estudiar no esté ocurriendo. Hay que tener en cuenta que la intensidad de fluorescencia producida cuando se complementan los fragmentos en células vivas es normalmente menos del 10% de la que presentan las proteínas fluorescentes intactas (Kerppola 2008). Además, esa señal fluorescente puede que se detecte solamente en una pequeña subpoblación de las células transfectadas, lo cual sería difícil de interpretar. Por un lado, podría deberse a una interacción inespecífica, pero también podría ser que dicha interacción ocurriera en respuesta a algún tipo de señal en una fracción reducida de células (Kerppola 2006). En estos casos, sería conveniente estudiar otras combinaciones de proteínas de fusión, para descartar posibles alteraciones estructurales que estén impidiendo la complementación bimolecular. Por otra parte otro factor que puede estar influyendo en la detección de complejos fluorescentes sería la competición con proteínas endógenas de la célula, que puede hacer que las proteínas de fusión se localicen en compartimentos subcelulares distintos o bien impida su asociación mediante interferencia estérica (Robida and Kerppola 2009).

#### **2.5.2.3.2 BiFC Multicolor para la visualización simultánea de múltiples interacciones en las células.**

Las proteínas a menudo tienen diferentes parejas con las que interactúan y pueden hacerlo utilizando la misma zona de interacción. De esta manera se establece una competición a la hora de darse las interacciones en células que expresan varias de estas proteínas alternativas de unirse. Esta competición es probablemente crítica para determinar la especificidad de las interacciones, y además, las interacciones con diferentes proteínas pueden darse también en localizaciones subcelulares distintas (Kerppola 2008).

La técnica BiFC multicolor permite detectar la formación de complejos fluorescentes con espectros distintos, por la asociación de fragmentos de proteínas

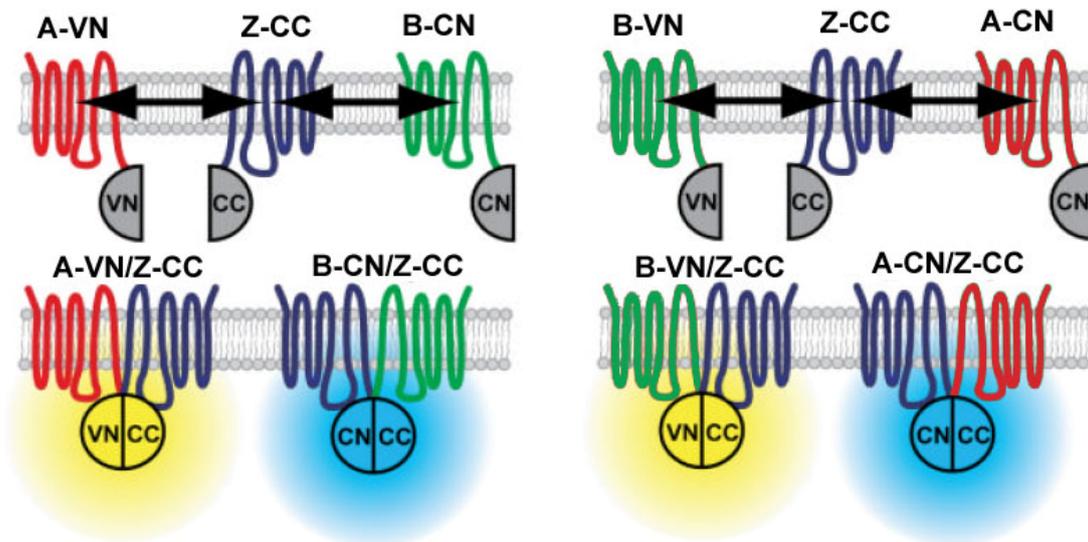
fluorescentes diferentes fusionados a las parejas de interacción alternativas. Mediante estos ensayos se puede comparar dentro de la misma célula la distribución de diferentes complejos de proteínas y estudiar la competición que se establece entre dos candidatos por interactuar con una proteína concreta (Hu and Kerppola 2003). Lo ideal sería que ambos complejos formados tuvieran el mismo orden de magnitud en cuanto a la fluorescencia emitida. No obstante, cualquier interferencia de señales entre ambos fluoróforos puede ser corregida mediante una adquisición secuencial de las imágenes y utilizando diferentes ondas de longitud para excitar y recoger la señal generada por los complejos (Kerppola 2008).



**Figura 2.27 Principio de la técnica BiFC Multicolor.** Dos proteínas alternativas, A y B, se fusionan a fragmentos de diferentes proteínas fluorescentes (fragmento N de YFP o Venus y fragmento N de CFP). Se coexpresan estas proteínas en células con una pareja de interacción común, Z, fusionada al fragmento complementario (extremo C de CFP). Los complejos A-VN155 con Z-CC155 se pueden diferenciar de los complejos de B-CN155 con Z-CC155 por las diferencias en los espectros de fluorescencia de cada uno (Kerppola 2009).

Para realizar un análisis cuantitativo de la eficiencia relativa de la formación de los complejos utilizando ensayos de BiFC multicolor, es necesario que los fragmentos de las proteínas fluorescentes que se emplean se asocien con igual eficiencia para ambos complejos. Para ello es necesario intercambiar los fragmentos entre las proteínas de fusión y realizar los experimentos usando ambas combinaciones (Kerppola 2009). Se han llevado a cabo diversos estudios sobre los fragmentos que mejor complementan a la hora de realizar los experimentos de BiFC multicolor. En estos trabajos se ha podido concluir que la mejor combinación para el análisis de estas interacciones es: el fragmento C155 de la proteína ECFP y los fragmentos N173 de las proteínas Cerulean y Venus (Hu and Kerppola 2003; Shyu et al. 2006).

Mediante el estudio de la formación de los complejos entre la combinación de vectores: A-VN173 y B-CN173 compitiendo por interactuar con Z-CC155 y por otro lado A-CN173 y B-VN173 compitiendo de nuevo por establecer una interacción con Z-CC155; se pueden detectar diferencias relativamente pequeñas en la eficiencia de la formación de los complejos entre proteínas estructuralmente relacionadas (Kerppola 2008) (Figura 2.28).



**Figura 2.28** Representación esquemática de la técnica BiFC Multicolor para estudiar diferencias en la formación de complejos usando combinaciones distintas de vectores. Modificado de (Vidi et al. 2010).

Para realizar los ensayos de BiFC multicolor, se emplea el mismo procedimiento que el descrito para el BiFC en el apartado anterior. No obstante, hay una consideración que hay que tener en cuenta para estos experimentos: el vector que codifica la proteína por la que las otras dos van a competir por unirse debe encontrarse en una concentración limitante respecto a los otros dos (Hu and Kerppola 2003). Como en los ensayos de BiFC, es necesario determinar los niveles de expresión de las proteínas de fusión y determinar si la mutación en zonas concretas de las proteínas eliminan la señal correspondiente al BiFC (Kerppola 2008).

Finalmente cabe destacar que mediante los ensayos de BiFC multicolor no es posible determinar si una proteína tiene más o menos afinidad de unión a otra, solamente se pueden obtener datos acerca de las eficiencias relativas de la formación de los complejos (Kerppola 2008).

# MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1 CULTIVOS CELULARES.

#### 3.1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares.

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares:

- La línea de adenocarcinoma de cérvix HeLa, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, USA).
- La línea de fibroblastos embrionarios de riñón 293T fue cedida por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de investigaciones del Cáncer, Salamanca).
- Las líneas de carcinoma de colon HCT116 y HCT 116 BaxKO fueron cedidas por el Dr. Christopher Börner (Institute of Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, Germany).

Las líneas celulares HeLa y 293T se cultivaron en medio DMEM (PAN Biotech GmbH) y las líneas HCT116 y HCT116 BaxKO en medio McCoy's (Gibco) suplementados ambos con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma), L-glutamina (PAN Biotech GmbH) 2mM y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycin, 100µg/ml, Sigma, Madrid). Estos medios se denominarán, en adelante, medio completo. Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> con tapón con filtro.

Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado (Heraeus Cell, Alemania), a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 2-3 días se realizaron los pases de los cultivos. Para ello, se determinó el número de células y su viabilidad (en azul Trypan, Sigma, Madrid) con ayuda de un hemocitómetro o cámara Neubauer al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i).

Todas las manipulaciones con las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar, España) y en condiciones estériles. El material usado, de vidrio y plástico, se esterilizó previamente en un autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta, España) durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron usando filtros de 0,22 µm (PALL Life Sciences).

#### 3.1.2 Contaje y determinación de la viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la tinción con azul Trypan (Sigma, Madrid) y contaje en una cámara Neubauer. Este colorante es capaz de teñir las células muertas que han perdido la integridad de su membrana, dándoles una tonalidad azulada. Sin embargo, las células vivas o apoptóticas

mantienen su membrana plasmática íntegra por lo que el colorante azul Trypan no es permeable a ellas. Para el contaje se mezclaron 50  $\mu$ l de suspensión celular, previamente homogeneizada, y 50  $\mu$ l de una solución estéril de azul Trypan al 0,4% en NaCl 0,15M que se depositaron sobre un hemocitómetro y se observaron al microscopio óptico (Optiphot, Nikon). Para determinar la densidad celular se contaron un número de cuadrantes completos de la cámara tal que se obtuvieran como mínimo 100 células totales (viables o no viables). La densidad celular se calculó como el número de células viables dividido del número de cuadrantes contados y multiplicado por la dilución de la suspensión celular y  $10^4$  (ajuste del tamaño de la cámara). La viabilidad celular se evaluó considerando el número de células no coloreadas (viables) respecto al número de células totales.

### 3.1.3 Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR.

La detección de micoplasmas mediante PCR se realizó de modo rutinario en todas las células en cultivo. Para una detección óptima, se tomaron células que habían permanecido en cultivo al menos 48 horas antes de realizar el análisis. Como muestra se tomó una pequeña cantidad de medio de cultivo de cada línea celular. Se centrifugó y se recogió el sobrenadante. En caso de no analizarse en el momento, los sobrenadantes se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores fueron:

Mico A: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'

Mico B: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3'

Como control negativo de la amplificación se preparó la misma mezcla anterior sustituyendo el sobrenadante celular por  $\text{H}_2\text{O}$  libre de DNasas y como control positivo se utilizó la propia bacteria o el sobrenadante de un cultivo celular contaminado, testado con anterioridad.

La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía por cada muestra:

- 5 $\mu$ l de tampón de reacción 10X (Invitrogen Corporation, Barcelona).
- 1,5 $\mu$ l de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Invitrogen Corporation, Barcelona).
- 2,5 $\mu$ l de Mico A 100 $\mu$ M
- 2,5 $\mu$ l de Mico B 10 $\mu$ M
- 5 $\mu$ l de dNTPs 2mM (Invitrogen Corporation, Barcelona).

- 2µl de sobrenadante
- 0,2 µl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation, Barcelona).
- 31,3µl de H<sub>2</sub>O libre de DNAsas.

La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem) con el siguiente programa de PCR:

- |                     |               |             |
|---------------------|---------------|-------------|
| - Hot Start         | 94 °C 3'.     | } 30 ciclos |
| - Desnaturalización | 94 °C 1'      |             |
| - Hibridación       | 60 °C 1'.     |             |
| - Extensión         | 72°C 1' y 30" |             |
| - Extensión         | 72°C 5'       |             |

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (apartado 3.2.4).

### 3.1.4 Congelación y descongelación de las líneas celulares.

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en N<sub>2</sub> líquido. En cada criotubo (Nunc, Dinamarca) se congelaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  de células en 500µl de medio completo suplementado con 10% de DMSO (Sigma, Madrid). Tras la resuspensión en el medio de congelación las células se almacenaron lo más rápidamente posible en un congelador de -80°C, durante 24 horas. Posteriormente se almacenaron en contenedores de N<sub>2</sub> líquido.

La descongelación se realizó mediante la adición gradual de medio completo a temperatura hasta 10 ml. A continuación, la suspensión se centrifugó 5 minutos a 200g y las células se resuspendieron en 8 ml de medio completo.

## 3.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

### 3.2.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos.

Todas las manipulaciones con medio autoclavado y con cultivos bacterianos, se realizaron dentro del área estéril creada por la llama de un mechero de alcohol. Para preparar medio Luria Bertani (LB), se pesaron 10 g de triptona (Panreac), 5 g de extracto de levadura (Panreac) y 5 g de NaCl (Panreac). Se disolvieron en 1L de agua

destilada, se vertió la disolución en botellas de vidrio de 500ml y se esterilizaron en un autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Tras atemperarse, las botellas se almacenaron a 4° C.

Para la preparación de placas de LB-agar, se pesaron 17,5 g de Plate Count Agar (Sigma) y se disolvieron en 1 L de agua destilada. Se vertió la mezcla en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en autoclave (Autestar Mod. 4376, Selecta). Una vez atemperado se le añadió el antibiótico de selección (Ampicilina, Roche) a 100 µg/ml, se homogeneizó por agitación suave y se fue vertiendo sobre placas Petri (50 ml/placa). El medio se dejó solidificar con las placas semiabiertas bajo la campana de flujo durante 1-2 horas. Una vez solidificado el LB-agar las placas se cerraron y se almacenaron a 4° C.

### **3.2.2 Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.**

Las bacterias competentes se prepararon a partir de un cultivo de 10 ml de *E. coli* XL1-Blue. A este cultivo se le añadió 100 ml de medio estéril y se dejó crecer a 37° C en el agitador orbital hasta alcanzar la densidad adecuada ( $A_{600nm} = 0,4$ ). Se recogió el volumen del cultivo en dos tubos estériles de 50 ml y se dejaron enfriar en hielo. Una vez fríos se centrifugaron 10 min a 4° C y 3500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de tampón de trituración (100mM CaCl<sub>2</sub>, Merck; 70mM MgCl<sub>2</sub>, Merck; 40mM CH<sub>3</sub>COONa, Panreac), se homogeneizó el pellet y se añadieron 30 ml de tampón de trituración. Se centrifugaron 15 min a 4° C 3500 rpm y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 ml de tampón de conservación (100mM CaCl<sub>2</sub>, Merck; 15% glicerol, Panreac). Las células se transformaron inmediatamente o se conservaron a -80° C en alícuotas de 400 µl.

Para la transformación de las bacterias se empleó el método de choque térmico para lo cual se descongeló en hielo una alícuota de bacterias competentes para cada transformación y se les añadió, dependiendo del plásmido, entre 50 y 100 ng de DNA. Se incubaron 20 minutos en hielo, y seguidamente 1' 30" a 42° C, en el baño húmedo. Inmediatamente se llevaron al hielo durante 2 minutos, tras lo cual se diluyó cada alícuota con 1ml de LB estéril y se incubaron 15 minutos a 37° C. Se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm, se descartó parte del sobrenadante y se resuspendieron las bacterias ya transformadas para sembrarse en una placa Petri de LB-agar con el antibiótico de selección a 100 µg/ml. Las placas se incubaron a 37° C en la estufa durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo se seleccionaron varias colonias de la placa, transfiriendo cada una a un tubo estéril con 10 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección (100 µg/ml). Esta operación se realizó con un asa de cultivo esterilizada a la llama y rozando con el asa las paredes del tubo para asegurar la correcta resuspensión. La suspensión bacteriana se incubó a 37° C durante 2-5 horas en el agitador orbital. Después, se vertió sobre un erlenmeyer con 50 ml de LB y antibiótico de selección a la concentración antes mencionada. El erlenmeyer se cerró con un tapón hecho de algodón y gasa estéril y se incubó durante toda la noche a 37° C en el agitador orbital.

### **3.2.3 Extracción de DNA plasmídico.**

Para obtener pequeñas cantidades de plásmido se utilizó el Kit GFX™ *Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de cultivo de partida fueron entre 1,5 y 3 ml y la elución final se realizó con 50 µl de TrisHCl pH 8 o H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

Para obtener cantidades mayores de plásmido se necesitaron cultivos de entre 50 y 100 ml, y el kit de extracción de DNA empleado fue el Kit Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (BioRad, USA). Las eluciones se realizaron en 500 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

### **3.2.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.**

Los geles de agarosa al porcentaje adecuado en cada caso se prepararon fundiendo la agarosa (Scharlau) en 30 ml de tampón. Para los geles de análisis se empleó el tampón TBE (0,045 M Tris-borato, 1 mM de EDTA) y para los geles destinados a purificación se empleó el tampón TAE (Tampón Tris-Acetato EDTA, Invitrogen). A esta mezcla se añadió SYBR-safe (1:10000, Invitrogen) para teñir el DNA y se vertió en los moldes para su gelificación.

A la muestra de DNA se añadió el tampón de carga 6X (Promega) o 10X (Takara) para determinar la posición del frente de la muestra en el gel. La estimación del peso de los fragmentos de DNA se realizó por comparación con marcadores de pesos moleculares. Como marcadores de pesos moleculares se emplearon λ/Hind III, 100bp y 10bp ladder (Invitrogen). Cuando se requirió un análisis cuantitativo de las muestras se emplearon los marcadores High DNA Mass Ladder y Low DNA Mass Ladder

(Invitrogen). La electroforesis se realizó a 90V, 400mA, durante 30 minutos. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad).

### **3.2.5 Purificación de fragmentos DNA.**

La purificación de los fragmentos de DNA de interés, bien tras una separación por técnicas electroforéticas como tras una reacción enzimática como PCR o tras la digestión con enzimas de restricción, se llevó a cabo con el Kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. En los casos en que se precisó purificar fragmentos de DNA separados mediante electroforesis, se procedió al corte de la banda de peso molecular deseado empleando un bisturí estéril.

### **3.2.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.**

La determinación de las concentraciones tanto de vectores como de fragmentos de DNA se realizó usando alícuotas de 3 µl con el espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare, Amersham).

### **3.2.7 Vectores para los ensayos de BiFC.**

Para analizar las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 se empleó la técnica Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC), basada en la complementación de dos fragmentos no fluorescentes de una proteína fluorescente cuando éstos están fusionados traduccionalmente a proteínas que interactúan entre sí (Hu et al. 2002).

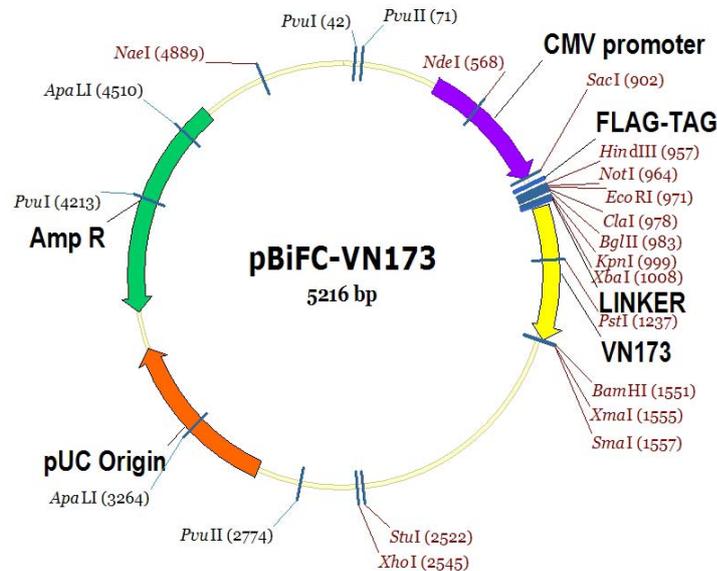
Para la técnica de BiFC se emplearon los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 (Hu and Kerppola 2003). Cada uno de estos vectores contiene un fragmento del cDNA de la proteína fluorescente verde Venus. El vector pBiFC-VN173 contiene el fragmento correspondiente a los aminoácidos 1 hasta el 173 de la proteína, mientras que en el pBiFC-VC155 se encuentra la secuencia que codifica desde el aminoácido 155 hasta el final de la proteína.

Inmediatamente delante del fragmento de la proteína fluorescente estos vectores presentan el sitio de clonaje múltiple (MCS) que permite la inserción de las secuencias

de interés. El clonaje del cDNA de nuestras proteínas objeto de estudio sin su correspondiente codón stop permite la generación de proteínas de fusión (Figura 3.1).

Estos vectores presentan también una secuencia entre el sitio de clonaje múltiple y el comienzo de la proteína fluorescente que actúa de “linker” o espaciador aportando flexibilidad y permitiendo el plegamiento correcto de los dos fragmentos la proteína de fusión. En el caso del vector pBiFC-VN173 la secuencia que actúa de linker es la correspondiente a los aminoácidos SRRSIAT y la del vector pBiFC-VC155 es EISRGT RPACKIPNDLKQKVMNH.

Además estos vectores contienen un “tag” (Flag-Tag en el vector pBiFC-VN173 y HA-Tag en el pBiFC-VC155) en el extremo 5' del MCS, lo cual habrá que tener en consideración a la hora de diseñar los oligonucleótidos para el clonaje de las diferentes secuencias, ya que es en este “tag” donde comenzará la traducción de la proteína de fusión.



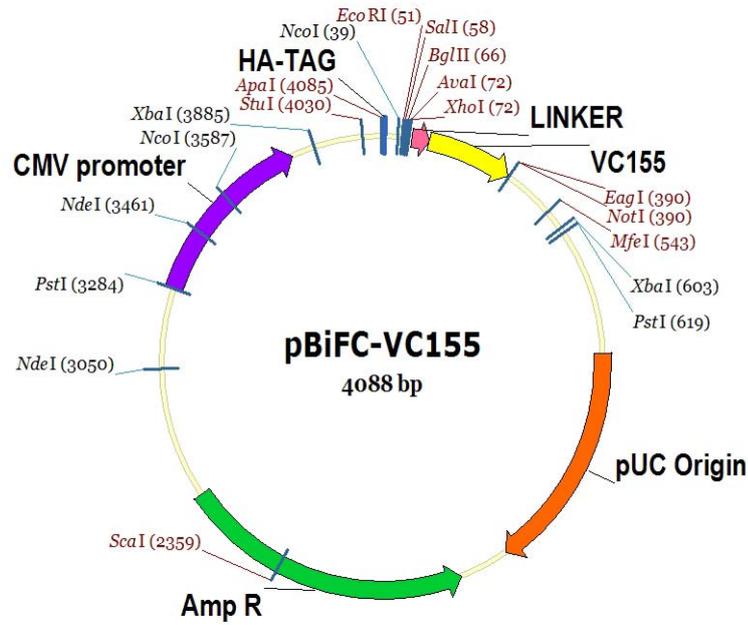


Fig.3.1 Mapas de los vectores utilizados para los ensayos de BiFC.

La siguiente figura muestra de manera esquemática el primer conjunto de proteínas de fusión que se generaron para estudiar las diferentes interacciones entre los miembros de esta importante familia implicada en la apoptosis.

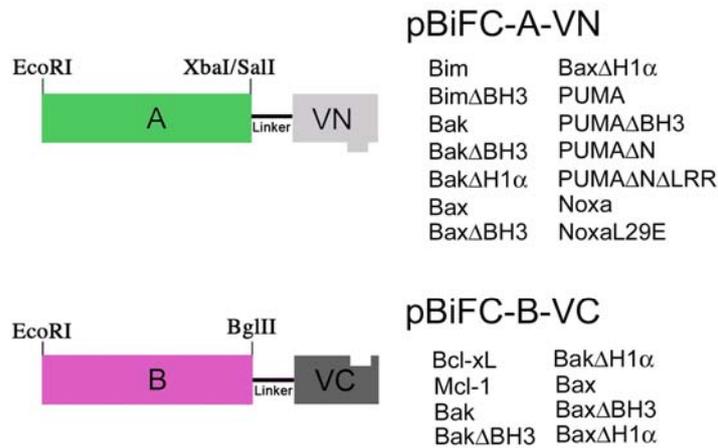
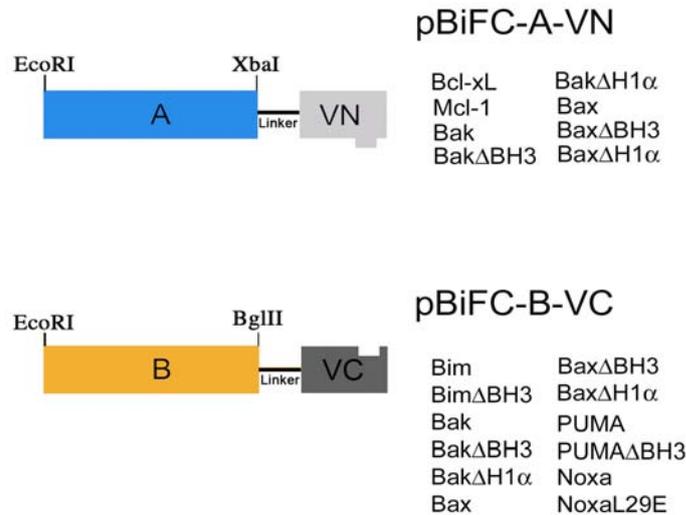


Figura 3.2 Esquema representativo del primer bloque de proteínas de fusión generadas para los estudios de BiFC.

Una consideración importante que se hace al describir la técnica BiFC es la necesidad de probar diferentes combinaciones de las proteínas de fusión, como se muestra en la figura 2.26, para descartar los impedimentos estéricos como causa de ausencia de señal fluorescente (Kerppola 2006). Por esta razón decidimos probar una serie de combinaciones diferentes de nuestras proteínas de fusión, intercambiando los fragmentos de la proteína fluorescente a los que las proteínas Bcl-2 se encontraban unidos (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Esquema representativo del segundo bloque de proteínas de fusión generadas para los estudios de BiFC.

### 3.2.7.1 Diseño de oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos y la determinación de las condiciones óptimas para la amplificación de las diferentes secuencias a clonar se llevaron a cabo con la ayuda de los programas Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) y Oligo 7. En el caso de los cDNAs a clonar en el vector pBiFC-VN173 se diseñaron los cebadores para la incorporación de los sitios de restricción EcoRI en el extremo 5' y XbaI en el 3' (con la excepción del cDNA de PUMA, en cuyo caso se sustituyó el sitio XbaI por Sall por encontrarse la secuencia de corte de la primera enzima de restricción dentro de la secuencia que codifica la proteína) para la posterior ligación en el vector entre estos dos sitios de corte. En el caso del vector pBiFC-VC155 los oligonucleótidos empleados para amplificar los insertos incorporaban los sitios EcoRI en el extremo 5' y BglIII en el 3'.

Constructo	Cebador	Secuencia (5'-3')
<b>BIM-VN</b>	Bim-Fw Bim-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCAAAGCAACCTTCTGAT GACTCG <b>TCTAGA</b> ATGCATTCTCCACACCAGGCGGAC
<b>MCL1-VC</b>	Mcl1-Fw Mcl1-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGTTTGGCCTCAAAAGAAACGC CGAACT <b>AGATCT</b> CTCTTATTAGATATGCCAAACCAGCTC
<b>BCLX<sub>L</sub>-VC</b>	BclX <sub>L</sub> -Fw BclX <sub>L</sub> -Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGTCTCAGAGCAACCGGGAG CGAACT <b>AGATCT</b> CTTTCCGACTGAAGAGTGAGCC
<b>BAK-VN</b>	BakVN-Fw BakVN-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGGT GACTGCT <b>CTAGAT</b> GATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAK-VC</b>	BakVC-Fw BakVC-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGT AGA <b>ACTAGATCT</b> CTGATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAX-VN</b>	BaxVN-Fw BaxVN-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGACGGGTCCGGGGAGCAG GACTCG <b>TCTAG</b> AGCCCATCTTCTTCCAGATGGT
<b>BAX-VC</b>	BaxVC-Fw BaxVC-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGACGGGTCCGGGGAGCAG CGAACT <b>AGATCT</b> CGCCCATCTTCTTCCAGATGGT
<b>PUMA-VN</b>	PUMA-Fw PUMA-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCCCGCGCACGCCAG GACTCG <b>GTCTGAC</b> ATTGGGCTCCATCTCGG
<b>PUMA<math>\Delta</math>N-VN</b>	PUMA $\Delta$ N-Fw PUMA $\Delta$ N-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AGGTCCTCAGCCCTCGCTCT GACTCG <b>TCTAGA</b> ATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTCT
<b>NOXA-VN</b>	Noxa-Fw Noxa-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGCCTGGGAAGAAGGC GACTCG <b>TCTAG</b> AGGTTCTGAGCAGAAGAG

**Tabla 3.1 Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de los diferentes constructos en los vectores pBiFC.** Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos para la posterior ligación en los vectores.

El cDNA de las diferentes proteínas se amplificó mediante PCR usando como molde los vectores en que se encontraban. El cDNA de las proteínas Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> y Bim se obtuvo de los vectores pcDNA3.1(+) de la biblioteca de vectores del laboratorio, mientras que el de Bax fue amablemente cedido por el Dr. Santos Susín (París). El cDNA de Bak y de Noxa se amplificaron a partir del vector pOTB7 y pCMV-Sport6, respectivamente, ambos adquiridos en Source Bioscience. El cDNA de PUMA se adquirió en Addgene, clonado en el vector pCEP4. El cDNA designado como PUMA  $\Delta$ N corresponde a la secuencia común de las diferentes isoformas de PUMA -  $\alpha$ . Este cDNA se adquirió en Source Bioscience clonado en el vector pT7T3D-Pacl.

La amplificación de los diferentes cDNA se realizó empleando la polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Pfx SuperMix (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una mezcla de reacción que contenía:

- 22,5  $\mu$ l AccuPrime™ Pfx SuperMix
- 200 nM oligonucleótidos Forward y Reverse
- 10 pg-200 ng DNA molde
- H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta 25  $\mu$ l

El programa de PCR seguido fue el siguiente:

- |                     |                                   |             |
|---------------------|-----------------------------------|-------------|
| - Hot Start         | 95 °C 5'.                         | } 35 ciclos |
| - Desnaturalización | 95 °C 1                           |             |
| - Hibridación       | 55-65°C (según el constructo) 1'. |             |
| - Extensión         | 72°C 1' y 30"                     |             |
| - Extensión         | 72°C 5'                           |             |

En todos los casos los oligonucleótidos se diseñaron de manera que se eliminara el codón “stop” del cDNA de la proteína de interés, consiguiendo así la generación de proteínas de fusión con el fragmento correspondiente de la proteína Venus.

Una vez realizada la PCR se procedió a comprobar la eficacia y especificidad de la amplificación por electroforesis de agarosa y se purificaron los fragmentos de interés (apartado 3.2.5).

### 3.2.7.2 Mutagénesis dirigida para generar proteínas de fusión control.

Como se ha descrito anteriormente en la Introducción un punto esencial en los estudios realizados mediante BiFC es la verificación de la especificidad de las interacciones detectadas. Para ello es necesario contar con una serie de controles, que de manera idónea corresponderían a proteínas que presentan mutaciones en la interfaz de unión con otra proteína, de manera que dicha interacción se vea interrumpida (Kerppola 2006). En este trabajo no se han utilizado mutaciones puntuales, aunque para ciertas interacciones entre proteínas de esta familia existe información bibliográfica acerca de los posibles aminoácidos implicados. Sin embargo, se han generado una serie de mutantes de delección de dominios que se ha considerado que pudieran jugar un papel importante en las interacciones, como el dominio BH3, la primera hélice  $\alpha$  (H1 $\alpha$ ) o secuencias cortas de determinados aminoácidos (LRR) (Figuras 3.2 y 3.3). En el caso puntual de la proteína “sólo-BH3” Noxa se optó por la sustitución simple de un aminoácido (L29E) debido al menor peso molecular de esta proteína, con el objetivo de minimizar la alteración en la

conformación que podría suponer la delección de un conjunto de residuos para la proteína.

La siguiente figura muestra un esquema de la estructura secundaria de las proteínas que se han modificado así como las mutaciones generadas para estudiar las interacciones por la técnica BiFC. La información acerca de la estructura de estas proteínas se obtuvo de la base de datos UniProt Knowledgebase. Cabe destacar que algunas delecciones no corresponden en su totalidad a los residuos que forman el dominio a deleccionar. Las mutaciones se hicieron según fue conveniente para poder aplicar la técnica de PCR solapada descrita en (Lee et al. 2004), tal y como se explica a continuación.

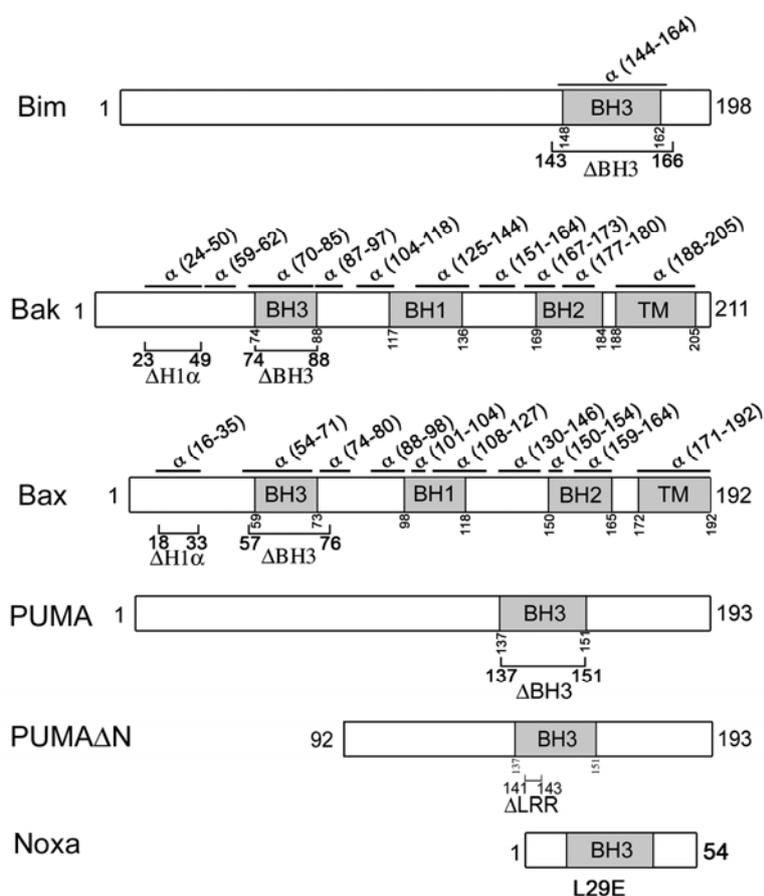


Figura 3.4 Esquema de la estructura secundaria y mutaciones realizadas para la obtención de proteínas de fusión control para su empleo en los experimentos de BiFC.

La siguiente figura muestra de forma esquemática el proceso de delección de determinadas secuencias que se llevó a cabo por PCR solapada (Figura 3.5). Los

oligonucleótidos designados como “Primer 2” y “Primer 3” contienen una región complementaria a la zona inmediatamente posterior y anterior, respectivamente, de la secuencia a deleccionar. De esta manera al hacer las dos PCR independientes se obtienen unos fragmentos de DNA que tienen una secuencia solapante. El siguiente ciclo de PCR, con cantidades equimolares de ambos fragmentos, requiere el uso de los oligonucleótidos de los extremos para terminar de completar la secuencia a amplificar.

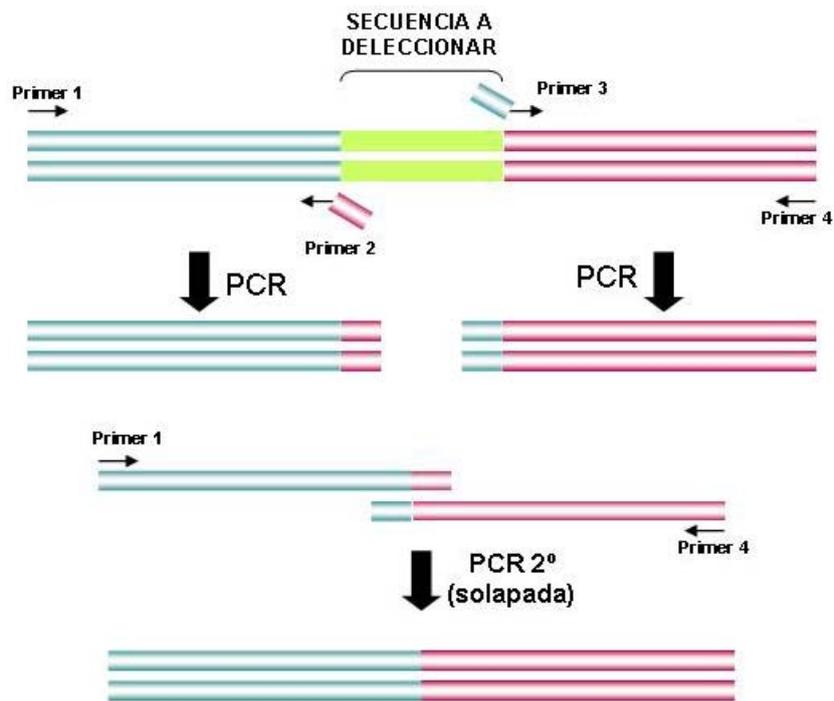


Fig. 3.5 Esquema de la técnica de Extensión por PCR Solapada.

Los oligonucleótidos empleados para los constructos generados por esta técnica fueron los siguientes:

Constructo	Cebador	Secuencia (5'-3')
<b>BIM<math>\Delta</math>BH3-VN</b>	Bim-Fw	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCAAAGCAACCTTGTGAT
	Bim $\Delta$ BH3-Rv	ATTATTCAAAAATACTGCAGGTTTCAGCCTG
	Bim $\Delta$ BH3-Fw	CAGGCTGAACCTGCAGTATTTTTGAATAAT
	Bim-Rv	GACTCG <b>TAGA</b> ATGCATTCTCCACACCAGGCGGAC

<b>BAKΔBH3-VN</b>	BakVN-Fw BakΔBH3-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGGT CTCTGAGTCATACTGCCCCATGGTGCT
	BakΔBH3-Fw BakVN-Rv	AGCACCATGGGGCAGTATGACTCAGAG GACTGCT <b>CTAGAT</b> GATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAKΔBH3-VC</b>	BakVC-Fw BakΔBH3-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGT CTCTGAGTCATACTGCCCCATGGTGCT
	BakΔBH3-Fw BakVC-Rv	AGCACCATGGGGCAGTATGACTCAGAG AGAACT <b>AGATCT</b> CTGATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAKΔH1α-VN</b>	BakVN-Fw BakΔH1α-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGGT GGCAGCCACCCCTTCAGAAGCAGAGGGCAG
	BakΔH1α-Fw BakVN-Rv	CTGCCCTCTGCTTCTGAAGGGGTGGCTGCC GACTGCT <b>CTAGAT</b> GATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAKΔH1α-VC</b>	BakVC-Fw BakΔH1α-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGCTTCGGGGCAAGGCCCAGT GGCAGCCACCCCTTCAGAAGCAGAGGGCAG
	BakΔH1α-Fw BakVC-Rv	CTGCCCTCTGCTTCTGAAGGGGTGGCTGCC AGAACT <b>AGATCT</b> CTGATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAXΔBH3-VN</b>	BaxVN-Fw BaxΔBH3-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGACGGGTTCGGGGAGCAG CTCTGCAGCTCCATCTTCTTGGTGGAGC
	BaxΔBH3-Fw BaxVN-Rv	CGTCCACCAAGAAGATGGAGCTGCAGAG GACTCGT <b>CTAGAG</b> CCCCATCTTCTCCAGATGGT
<b>BAXΔBH3-VC</b>	BaxVC-Fw BaxΔBH3-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGACGGGTTCGGGGAGCAG CTCTGCAGCTCCATCTTCTTGGTGGAGC
	BaxΔBH3-Fw BaxVC-Rv	CGTCCACCAAGAAGATGGAGCTGCAGAG CGAACT <b>AGATCT</b> CGCCCATCTTCTCCAGATGGT
<b>BAXΔH1α-VN</b>	BaxVN-Fw BaxΔH1α-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGACGGGTTCGGGGAGCAG CATTGCCCCTGCTCGCTCAGAGCTGGTG
	BaxΔH1α-Fw BaxVN-Rv	CACCAGCTCTGAGCGAGCAGGGCGAATG GACTCGT <b>CTAGAG</b> CCCCATCTTCTCCAGATGGT
<b>BAXΔH1α-VC</b>	BaxVC-Fw BaxΔH1α-Rv	CGAACT <b>GAATTC</b> GGATGGACGGGTTCGGGGAGCAG CATTGCCCCTGCTCGCTCAGAGCTGGTG
	BaxΔH1α-Fw BaxVC-Rv	CACCAGCTCTGAGCGAGCAGGGCGAATG CGAACT <b>AGATCT</b> CGCCCATCTTCTCCAGATGGT
<b>PUMAΔBH3-VN</b>	PUMA-Fw PUMA-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> AATGGCCCGCGCACGCCAG GACTCG <b>GTGAC</b> ATTGGGCTCCATCTCGG
<b>PUMAΔNΔLRR-VN</b>	PUMAΔN-Fw PUMAΔNΔLRR-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> CAGGTCCTCAGCCCTCGCTCT TGCGTTGAGGTCGTCCCCGATCTCCCGGGCCCA
	PUMAΔNΔLRR-Fw PUMAΔN-Rv	TGGGCCCGGGAGATCGGGGACGACCTCAACGCA GACTCGT <b>CTAGA</b> ATTGGGCTCCATCTCGGGGGCTCT

**Tabla 3.2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de las diferentes deleciones de los constructos en los vectores pBiFC.** Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos para la posterior ligación en los vectores.

Se llevó a cabo el primer ciclo de amplificación para cada constructo siguiendo el mismo procedimiento y los moldes especificados en el apartado anterior. Tras esto, se separaron y purificaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis de agarosa (apartado 3.2.5). Para realizar el segundo ciclo de amplificación se usó como molde una mezcla equimolar de los dos fragmentos obtenidos y los oligonucleótidos de los extremos que introducen los nuevos sitios de restricción. A continuación, se pasó a la purificación final del fragmento de DNA, ya sin la secuencia que se quería delecionar.

El cDNA de PUMA sin su dominio BH3 (PUMA  $\Delta$ BH3) fue adquirido en Addgene, clonado en el vector pCEP4 y con la delección generada, que se usó como molde para su posterior clonaje en el vector pBiFC-VN173.

Para la generación de un vector control a partir del cDNA de Noxa, se decidió hacer un cambio de aminoácidos por mutagénesis dirigida en lugar de una delección. Esto fue debido al menor tamaño de esta proteína respecto al resto de proteínas empleadas de la misma familia, y con el objetivo de alterar lo menos posible ésta. Para ello, se encargó a la empresa estadounidense Mutagenex, la realización de un mutante de Noxa que contuviera una sustitución de la leucina (L) en posición 29 por un glutámico (E).

### **3.2.7.3 Construcción de un vector de Bcl-X<sub>L</sub> fusionado al extremo carboxilo del fragmento Venus-C155.**

Como se ha explicado en los apartados anteriores, los vectores empleados para los ensayos de complementación de fluorescencia están diseñados de manera que la proteína de fusión que se genera tiene siempre el fragmento de la proteína fluorescente Venus fusionado al extremo carboxilo de la proteína de interés. En el caso de la proteína Bcl-X<sub>L</sub> los controles indicaban que la fusión en el extremo C-terminal afectaba a su localización subcelular (ver Resultados, apartado 4.1.3.2). Por este motivo se decidió generar una fusión de ésta con el fragmento carboxilo de la proteína Venus (VC155) delante de ella.

Para construir esta fusión, se decidió mantener la mayor parte de la secuencia del linker (TRPACKIPNDLKQKVMNH) que presenta el vector pBiFC-VC155, para no alterar el plegamiento y flexibilidad que éste aporta. Para la amplificación del fragmento Venus-C155 así como del linker, por separado, se usó como molde el propio vector pBiFC-VC155. Para la obtención de la secuencia de Bcl-X<sub>L</sub> se utilizó el

vector pcDNA3.1(+), como en el apartado 3.2.7.1 Se realizaron 3 ciclos de PCR, para amplificar, por separado cada una de las partes de la fusión. Para cada amplificación se incluyó en los oligonucleótidos empleados parte de la secuencia adyacente a fusionar, de manera que se pudieran llevar a cabo 2 ciclos de PCR solapada y llegar así a generar el constructo final. Las reacciones de PCR se realizaron como se describe en el apartado 3.2.7.1.

Los primers empleados fueron los siguientes (como nombre se les ha designado el número al que corresponden en el esquema de la figura 3.6):



Como en el resto de clonajes descritos anteriormente, los oligonucleótidos de los extremos incorporan los sitios de restricción (secuencias en negrita) necesarios para la ligación en el vector pBiFC-VC155 y se tiene en cuenta la pauta de lectura, así como la necesidad de eliminar el codón stop del fragmento de la proteína Venus y la incorporación de éste en la secuencia de Bcl-X<sub>L</sub> (tripleto subrayado). Las secuencias marcadas en estos oligonucleótidos en cursiva son las correspondientes a las zonas de solapamiento añadidas para llevar a cabo los diferentes ciclos de PCR. Los nucleótidos con doble subrayado en los primers 4 y 5 corresponden al sitio de restricción ClaI, añadido inmediatamente antes de Bcl-X<sub>L</sub> y que, juntamente con el otros sitio de restricción incorporado con el primer 6, servirá para el subclonaje de otras proteínas en este vector.

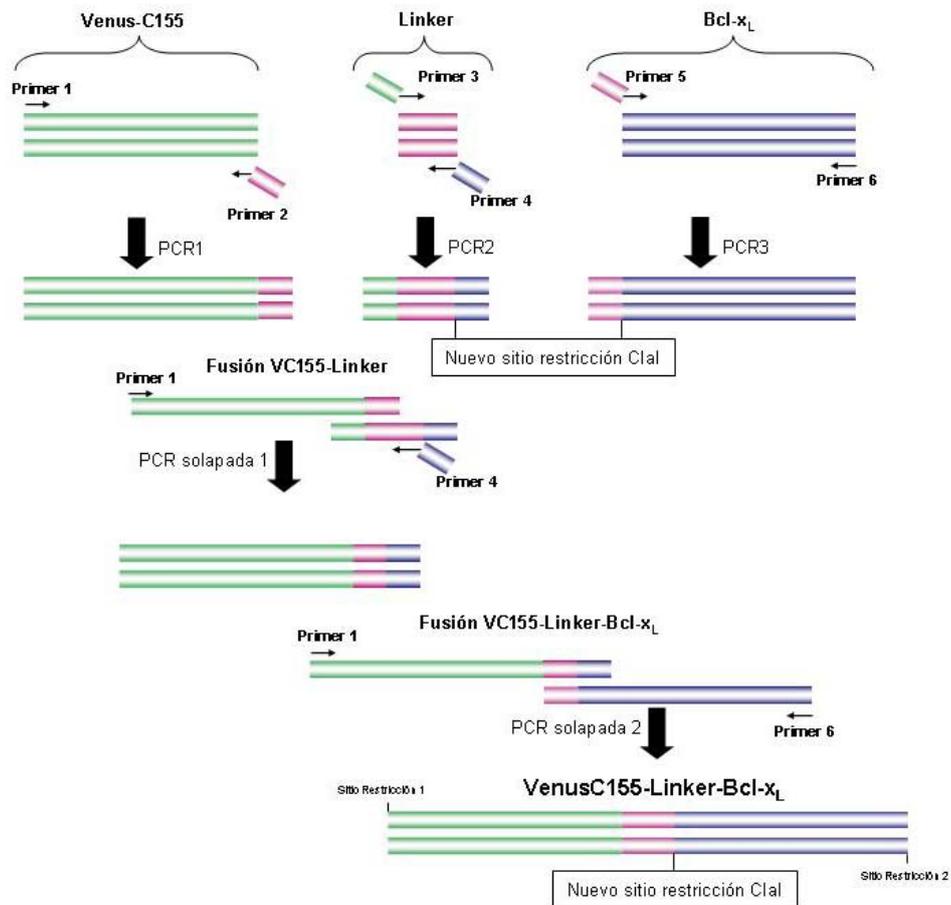


Figura 3.6 Esquema de las reacciones de PCR llevadas a cabo para la obtención del constructo VenusC155-Linker-Bcl-X<sub>L</sub>.

#### 3.2.7.4 Construcción de un vector de Bak fusionado al extremo carboxilo del fragmento Venus-C155.

En el caso de la proteína Bak decidimos, al igual que para Bcl-X<sub>L</sub>, cambiar la orientación de la proteína de fusión. Se decidió verificar los resultados con la proteína VC-Bak, a pesar de que no se detectó una alteración aparente de la localización de Bak-VC en los ensayos de BiFC. Para ello se empleó el vector diseñado anteriormente para generar la fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Se llevó a cabo la digestión de ese vector con las enzimas Clal y BgIII (entre las que se encontraba clonado Bcl-X<sub>L</sub>) para linearizar el vector (apartado 3.2.9). Por otra parte se amplificó el cDNA de Bak utilizando un oligonucleótido que incorporara el sitio Clal al principio de su secuencia y otro que incorporara el sitio BgIII detrás de su codón de parada.

**Primer 1.** 5'- GACTCGATTCGATATGGCTTCGGGGCAAGGC -3'

**Primer 2.** 5'- GACTCGAGATCTCTCATGATTTGAAGAATTTTCG -3'

Las reacciones de PCR se realizaron como se describe en el apartado 3.2.7.1.

### 3.2.7.5 Generación de vectores para BiFC Multicolor.

Para generar los vectores para los experimentos de BiFC multicolor, fue necesario subclonar los cDNA de las proteínas objeto de estudio fusionadas al otro fragmento de la proteína fluorescente. Las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa, se clonaron fusionadas al fragmento carboxilo de la proteína fluorescente, para evaluar la formación de complejos con proteínas fusionadas al fragmento amino de la proteína Venus y de la Cerulean (Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>, Bak y Bax). Todas las proteínas fueron clonadas tanto en los vectores con el fragmento correspondiente de la proteína Venus así como Cerulean. Debido a que los sitios de clonaje múltiple (MCS) de los vectores con la proteína Venus y Cerulean eran idénticos, se emplearon los mismos oligonucleótidos para los clonajes (Tabla 3.3).

Constructo	Cebador	Secuencia (5'-3')
<b>BIM-VC/CC</b>	BimC-Fw BiFC-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> GGATGGCAAAGCAACCTCTGAT GACTCGAGATCTCATGCATTCTCCACACCAGGCGGAC
<b>MCL1-VN/CN</b>	Mcl1N-Fw Mcl1N-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> CAATGTTTGGCCTCAAAAGAAACGC GACTCGTCTAGATCTTATTAGATATGCCAAACCAGCTC
<b>BCLX<sub>L</sub>-VN/CN</b>	Bcl-X <sub>L</sub> N-Fw Bcl-X <sub>L</sub> N-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> CAATGTCTCAGAGCAACCGGGAG GACTCGTCTAGATTTCCGACTGAAGAGTGAGCC
<b>BAK-VN/CN</b>	BakVN-Fw BakVN-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> CAATGGCTTCGGGGCAAGGCCAGGT GACTGCTCTAGATGATTTGAAGAATCTTCGTACCACA
<b>BAX-VN/CN</b>	BaxVN-Fw BaxVN-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> CAATGGACGGTCCGGGGAGCAG GACTCGTCTAGAGCCCATCTTCTCCAGATGGT
<b>PUMA-VC/CC</b>	PUMA-Fw PUMA-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> GGATGGCCCGCGCACGCCAG GACTCGAGATCTCATTGGGCTCCATCTCGG
<b>NOXA-VC/CC</b>	Noxa-Fw Noxa-Rv	GACTCG <b>GAATTC</b> GGATGCCTGGGAAGAAGGC GACTCGAGATCTCGGTTCTGAGCAGAAGAG

**Tabla 3.3** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de los diferentes constructos para BiFC multicolor. Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos para la posterior ligación en los vectores.

Una vez obtenidos los vectores deseados se procedió a realizar las transfecciones correspondientes (apartado 3.3.1). Debido a la presencia de la proteína fluorescente Cerulean, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 434 nm y 477 nm respectivamente, para estudiar las interacciones mediante fue necesario un citómetro de flujo equipado con un láser de 405nm (FACSAria, apartado 3.4.2). Para determinar la localización de los complejos por microscopía confocal se empleó el microscopio Leica SP2 (apartado 3.5.2).

### **3.2.8 Vectores retrovirales para la sobreexpresión estable de proteínas.**

Mediante la generación de retrovirus, capaces de integrar parte de su genoma en los cromosomas de las células eucariotas en división, se pueden obtener líneas celulares que sobreexpresen un determinado gen de manera estable. Los virus que se obtienen mediante este método están modificados de forma que cuando infectan una célula diana pueden insertar en su genoma el fragmento de vector comprendido entre sus secuencias LTR, pero no pueden continuar su propagación por carecer de las secuencias génicas que codifican los factores de virulencia.

El primer paso es el clonaje del gen exógeno deseado dentro de esta región de inserción del vector retroviral. El vector empleado en este trabajo fue el pBABE-puro, amablemente cedido por Reinhard Wallich (Alemania), cuyo mapa se presenta en la figura 3.7.

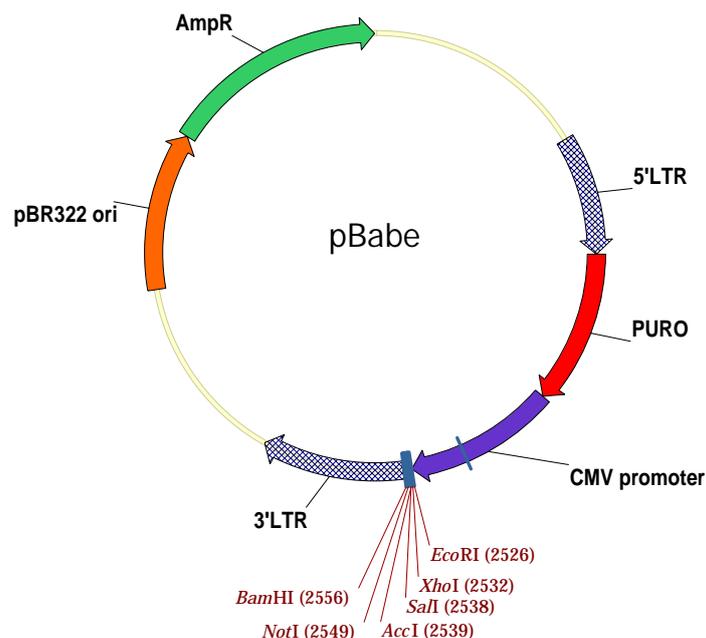


Figura 3.7 Mapa del vector pBABE.

### 3.2.8.1 Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de forma estable.

Con el objetivo de conseguir dos líneas derivadas de HeLa que sobreexpresaran las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub>, se procedió al clonaje de los cDNA completos de estas proteínas siguiendo el mismo protocolo explicado en el apartado 3.2.7.1. La construcción pBABE-Bcl-X<sub>L</sub> fue realizada y amablemente cedida por Marta Pérez (Universidad de Zaragoza). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de Mcl-1 fueron (las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos):

**pBABE-Mcl-1 Fw: 5'-CGAACTGAATTCATGTTTGGCCTCAAAGAAACGC-3'**

**pBABE-Mcl-1 Rv: 5'-CGAACTGTCGACCTATCTTATTAGATATGCCAAAC-3'**

Una vez obtenido el fragmento de la proteína Mcl-1 con los sitios de restricción adecuados, se procedió a la digestión con las enzimas de restricción (EcoRI y Sall, Takara), tanto de este fragmento como del vector pBABE, siguiendo las pautas del apartado 3.2.9. Finalmente se purificaron y cuantificaron ambos fragmentos antes de pasar a su ligación (apartado 3.2.10), transformación de bacterias (apartado 3.2.2) y análisis de las colonias (apartado 3.2.11).

### 3.2.8.2 Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas de fusión fluorescentes de forma estable.

Para la obtención de líneas derivadas de HeLa que sobreexpresaran las proteínas de fusión Mcl-1-EYFP, EYFP-Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP y EYFP-Bcl-X<sub>L</sub>, se procedió generar las fusiones mediante PCR solapada (descrito en la Figura 3.2). Se tuvo en cuenta para ello, la necesidad de eliminar el codón stop de la primera proteína así como de introducir una secuencia espaciadora entre ambos cDNA (secuencia correspondiente a los aminoácidos GRSIAT). El cDNA de las proteínas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> se amplificó a partir del vector pcDNA3.1(+) de la biblioteca de vectores del laboratorio y el cDNA de la proteína fluorescente EYFP se obtuvo a partir del vector pEYFP-N1.

Los oligonucleótidos empleados se detallan en la siguiente tabla:

Construtto	Cebador	Secuencia (5'-3')
<b>Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP</b>	BclX <sub>L</sub> -Fw BclX <sub>L</sub> -Rv Linker	TTGATCG <b>GAATTC</b> ATGTCTCAGAGCAACCGGGA GGTGGCGATGGATCTGAATCCTTTCCGACTGAAGAGTGAGAA
	EYFP-Fw Linker EYFP-Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGA CGAC <b>GTCGACT</b> TACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
<b>EYFP-Bcl-X<sub>L</sub></b>	EYFP-Fw EYFP-Rv Linker	GACTCG <b>GAATTC</b> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG GGTGGCGATGGATCTGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
	BclX <sub>L</sub> -Fw Linker BclX <sub>L</sub> -Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGTCTCAGAGCAACCGGGAG CGAC <b>GTCGACT</b> CATTTCCGACTGAAGAGTG
<b>Mcl-1-EYFP</b>	Mcl1-Fw Mcl1-Rv Linker	CGAACT <b>GAATTC</b> ATGTTTGGCCTCAAAGAAACGC GGTGGCGATGGATCTGGATCCTCTTATTAGATATGCCAAACCACTC
	EYFP-Fw Linker EYFP-Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGA CGAC <b>GTCGACT</b> TACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
<b>EYFP-Mcl-1</b>	EYFP-Fw EYFP-Rv Linker	GACTCG <b>GAATTC</b> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG GGTGGCGATGGATCTGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
	Mcl1-Fw Linker Mcl1-Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGTTTGGCCTCAAAGAAAC CGAACT <b>GTCGACT</b> TATCTTATTAGATATGCCAAAC

**Tabla 3.4 Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de las fusiones de Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1 con EYFP.** Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos para la posterior ligación en los vectores y la secuencia en cursiva representa el espaciador introducido entre ambos cDNA.

Tras los dos ciclos de PCR, y una vez comprobada por electroforesis en gel de agarosa la fusión de ambos fragmentos se procedió a su digestión con las enzimas EcoRI y Sall (Takara) y ligación en el vector retroviral pBabe linealizado con las

mismas enzimas (siguiendo las pautas de los apartados 3.2.9 y 3.2.10). A continuación, se transformaron bacterias y se analizaron las colonias positivas como se describe en los apartados 3.2.2 y 3.2.11, respectivamente.

### 3.2.8.3 Vectores retrovirales para la sobreexpresión de proteínas de fusión de Bax.

Con el objetivo de estudiar la localización de la proteína proapoptótica Bax, se generaron dos vectores retrovirales para ser transfectados a las células: pBABE-Bax-EYFP y pBABE-EYFP-Bax. La fusión de las proteínas Bax y EYFP se realizó mediante PCR overlap o solapada como se describe en la Figura 3.2. En ambas fusiones, se eliminó el codón stop de la proteína situada en primera posición y entre ésta y la segunda proteína se incluyó una secuencia de nucleótidos correspondiente a los aminoácidos GSRSIAT, que actúa de espaciador o linker para permitir el plegamiento de las dos proteínas de forma independiente. Las parejas de oligonucleótidos empleados para cada fusión fueron:

Construccto	Cebador	Secuencia (5'-3')
<b>BAX-EYFP</b>	Bax-Fw Bax-Rv Linker	GACTCG <b>GAATTC</b> ATGGACGGGTCCGGGGAGCAG GGTGGCGATGGATCTGGATCCGCCCATCTTCTTCCAGATGGT
	EYFP-Fw Linker EYFP-Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA CGAC <b>GTCGACT</b> TACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
<b>EYFP-BAX</b>	EYFP-Fw EYFP-Rv Linker	GACTCG <b>GAATTC</b> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG GGTGGCGATGGATCTGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
	Bax-Fw Linker Bax-Rv	GGATCCAGATCCATCGCCACCATGGACGGGTCCGGGGAGCAG CGAC <b>GTCGACT</b> CAGCCCATCTTCTTCCAGAT

**Tabla 3.5 Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la generación de las fusiones de Bax y EYFP.** Las secuencias marcadas en negrita corresponden a los sitios de restricción introducidos para la posterior ligación en los vectores y la secuencia en cursiva representa el espaciador introducido entre ambos cDNA.

Una vez obtenidos los fragmentos de las dos proteínas fusionados, se siguió el procedimiento descrito a continuación de digestión enzimática del DNA (EcoRI y Sall; Takara), ligación en el vector pBABE linearizado, transformación bacteriana (apartado 3.2.2) y selección de colonias que hubieran captado el vector con el inserto incorporado (apartado 3.2.11).

La localización de estas dos proteínas de fusión se estudió en las líneas HeLa, HeLa-Mcl-1y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub>, mediante microscopía confocal (apartado 3.5) y de time-lapse (apartado 3.7).

### 3.2.9 Digestión de los insertos y linearización de los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 / pBABe.

Una vez obtenidos los cDNAs de las fusiones para los ensayos de BiFC, tanto de las proteínas completas como sus mutantes de delección, se procedió a la digestión se éstos y de los plásmidos pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 con las enzimas de restricción correspondientes. La mezcla de digestión contenía:

<b>A</b>	<b>B</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ng inserto / 100 ng pBiFC-VN173/CN173</li> <li>• Tampón de reacción M 10X / H 10X</li> <li>• 1µl EcoRI</li> <li>• 1µl XbaI / Sal I</li> <li>• H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta 10 µl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 ng inserto / 100 ng pBiFC-VC155/CC155</li> <li>• Tampón de reacción H 10X</li> <li>• 1µl EcoRI</li> <li>• 1µl Bgl II</li> <li>• H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta 10 µl</li> </ul>

Una vez obtenidos los insertos para clonar en el vector retroviral pBABE se llevó a cabo su digestión en una mezcla que contenía:

- 50 ng inserto / 100 ng pBABE
- Tampón de reacción H 10X
- 1µl EcoRI
- 1µl Sal I
- H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta 10 µl

En todos los casos primero se añadió la enzima XbaI, Sal I o Bgl II (Takara) y se incubó 1 hora a 37°C con el tampón correspondiente (Takara); a continuación, se añadió a la mezcla la enzima EcoRI (Takara) dejando 2 horas más la digestión a 37°C. Una vez completada la digestión, se procedió a la purificación tanto de plásmidos linearizados como de insertos (apartado 3.2.5), y a su cuantificación (apartado 3.2.6) para proceder a la ligación de los mismos.

### **3.2.10 Ligación de los insertos en los vectores pBiFC-VN173 y pBiFC-VC155 / pBABE.**

El último paso para la obtención de los vectores pBiFC y pBABE con sus determinados insertos fue la ligación de los plásmidos linearizados con los fragmentos digeridos. La relación molar de vector : inserto empleada fue de 1:3 o 1:5 y la mezcla de ligación contenía:

- 100 ng plásmido linearizado
- ng de inserto correspondientes a 3-5 veces los moles de plásmido
- Tampón de ligasa 2X Rapid Ligation (Promega) o 10X (Promega)
- 1  $\mu$ l Ligasa T4 (Promega)
- H<sub>2</sub>O milliQ estéril hasta 10  $\mu$ l.

Tras incubar la mezcla de ligación unas 3 horas (en caso de usar el tampón de ligación rápida 2X) o toda la noche (en el caso del tampón 10X), se procedió a la transformación de una alícuota de bacterias *E.Coli* XL-Blue- 1 competentes (apartado 3.2.2) que se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina.

### **3.2.11 Análisis de colonias positivas.**

Después de 24 horas de la siembra de las placas, se seleccionaron varias colonias cada una de las cuales se sembró en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina y se cultivaron durante otras 24 horas. A continuación se realizó una PCR de las colonias usando las mismas condiciones y cebadores que para la amplificación inicial del inserto de cDNA (apartado 3.2.7.1). El resultado de la PCR se analizó el resultado por electroforesis de agarosa en TBE. Las colonias que resultaron positivas se traspasaron a un volumen de 100 ml de medio LB con ampicilina y tras 24 horas en cultivo se llevó a cabo la extracción de vector con el Kit Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (BioRad). Las secuencias de todos los clonajes se verificaron en el Servicio de Secuenciación Genómica del CNIO, Madrid.

### 3.3 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

#### 3.3.1 Transfección transitoria de los vectores pBiFC.

La transfección transitoria de los diferentes vectores pBiFC se realizó en las líneas celulares adherentes HeLa y las derivadas HeLa-Vector, HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub>. Algunas transfecciones se llevaron a cabo también en las líneas de carcinoma de colon HCT116 y HCT116 BaxKO. Se utilizó Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), reactivo basado en la transfección mediada por lípidos catiónicos. Siguiendo las indicaciones del fabricante, las células se sembraron a una densidad adecuada de manera que a las 24 horas de la siembra éstas se encontraran a una confluencia de alrededor del 80% para garantizar una buena transfección y minimizar la citotoxicidad. Además el medio de cultivo de estas células no contenía antibióticos como recomienda el fabricante, para evitar la posible toxicidad inducida por éstos al aumentar la permeabilidad de las células durante el proceso de transfección. Se evaluaron diferentes relaciones DNA : Lipofectamina y finalmente se escogió la relación 1 µg DNA : 3 µl Lipofectamina.

A continuación estudiamos la cantidad de vector a transfectar en función del número de células, llegando a un compromiso entre una expresión no demasiado elevada pero sí lo suficiente como para detectar los posibles complejos formados. En este caso decidimos transfectar 3 µg/10<sup>6</sup> células de cada vector. Además se transfectó con la misma cantidad de un tercer vector, pAL2-Myc que contenía el cDNA de la proteína fluorescente mRFP, lo que nos permite evaluar la eficiencia de transfección. La dilución de los vectores y de la Lipofectamina se realizó en Opti-MEM Reduced Serum Medium (Invitrogen). Tras 30 minutos incubando la mezcla de DNA con Lipofectamina a temperatura ambiente, ésta se añadió a las células gota a gota.

Unas 24 horas después se procedió a analizar la formación de los complejos mediante citometría de flujo (FACS, apartado 3.4) y microscopía de time-lapse (apartado 3.7) y confocal (apartado 3.5.2). Además se determinó, para cada pareja, los niveles de sobreexpresión por Western-Blot (apartado 3.8). En determinados casos también se analizó la apoptosis producida por la transfección de las diferentes proteínas por citometría de flujo (apartado 3.4.3).

En los experimentos en los que se transfectó con dos proteínas proapoptóticas, fue necesario añadir un inhibidor general de caspasas, zVAD-fmk (50 µM, Bachem), para mantener la integridad de las células y poder estudiar la formación de los complejos.

En estos casos, fue necesario reducir la cantidad de vectores transfectados. Se determinó que la cantidad adecuada para evitar la sobreexpresión de las proteínas de fusión era  $1,5 \mu\text{g}/10^6$  células de cada vector.

### **3.3.2 Generación de sobrenadantes retrovirales para la transfección estable.**

Una vez obtenidos los vectores retrovirales descritos en el apartado 3.2.8 se procedió a la generación de las correspondientes partículas virales para posterior infección de las células. Se empleó la línea celular 293T como empaquetadora de los virus. Estas células se transfectaron con tres vectores distintos: pBABE con el inserto correspondiente, pNVUL-MLV-gag-pol (que contiene las secuencias que codifican la retrotranscriptasa viral y las proteínas de la cápside vírica) y pMDG-VSV (que contiene las secuencias codificantes de las proteínas de la envuelta del virus).

Se sembraron  $1,8 \times 10^6$  células 293T en 3 ml de medio DMEM completo en placas de  $60 \text{ mm}^2$  siguiendo el protocolo descrito en (Carvajal-Vergara et al. 2005). Después de 24 horas se añadió  $1,5 \mu\text{l}$  de cloroquina  $25 \mu\text{M}$  a cada placa y se agitaron las placas se forma suave.

Se prepararon las mezclas de transfección en un volumen final de 1ml:

- $3 \mu\text{g}$  pBABE con el inserto correspondiente o vacío para generar línea control
- $2,5 \mu\text{g}$  de pMDG-VSV
- $5 \mu\text{g}$  de pNVUL-MLV-gag-pol
- $61 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Merck)
- $500 \mu\text{l}$  de HBS 2X (NaCl  $274 \text{ mM}$ , Merck; Hepes  $50 \text{ mM}$ , Sigma;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $1,5 \text{ mM}$ , Merck; pH 7)
- $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ estéril hasta 1 ml.

La mezcla anterior se burbujeó durante 15 segundos con una pipeta Pasteur con filtro y se añadió gota a gota a la placa de células 293T correspondiente. Se agitaron las placas suavemente y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante al menos 6 horas. Después, el medio de transfección se sustituyó por 4 ml de OptiMEM (Invitrogen) y tras otras 48 horas más en cultivo se recogieron los sobrenadantes donde se encontraban los virus.

Los sobrenadantes se filtraron (0,22  $\mu\text{m}$ , Pall Corporation, USA) para eliminar posibles restos celulares de 293T.

Todo el material utilizado para la manipulación de los virus fue autoclavado posteriormente.

### **3.3.3 Infección de la línea celular HeLa con retrovirus.**

Para cada infección se sembraron, en placas de 24 pocillos,  $1,5 \times 10^4$  células 24 horas antes de la adición del correspondiente sobrenadante viral. Tras este tiempo se añadió el sobrenadante retroviral y polibreno (Sigma) a una concentración final de 6  $\mu\text{g/ml}$  para incrementar la eficiencia de infección. Se procedió, a continuación, a centrifugar la placa durante 2 horas a 1500 rpm y  $37^\circ\text{C}$ , tras lo cual se cambió el medio por DMEM completo y se incubó unas 48 horas.

Para la selección de las células infectadas por los retrovirus que contenían los vectores pBabe-Mcl-1 y pBabe-Bcl-X<sub>L</sub> se realizó una selección por resistencia al antibiótico puromicina (10  $\mu\text{g/ml}$ , Invivogen) ya que este vector retroviral confiere resistencia a las células que lo hayan incorporado en su genoma. Para determinar el momento en que las células no infectadas habían sido eliminadas, se sembró otro pocillo de HeLa a la misma densidad celular que no fueron infectadas pero a las que sí se adicionó la puromicina. De esta manera, consideramos que en el momento en que las células del pocillo no infectado estaban todas muertas, las células que continuaran vivas en el pocillo de las infectadas debían haber incorporado en su genoma el fragmento del vector pBabe. Estas células se lavaron con medio DMEM completo y posteriormente se realizó una selección clonal mediante dilución límite (ver siguiente apartado).

Para las células infectadas con los retrovirus generados con los vectores pBabe-Mcl-1-EYFP, pBabe-EYFP-Mcl-1, pBabe-Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP y pBabe-EYFP-Bcl-X<sub>L</sub> se pudo comprobar la eficiencia de infección por microscopía de fluorescencia. Posteriormente se realizó la selección clonal por dilución límite, en ausencia de puromicina.

Cabe destacar que la sobreexpresión de la proteína Bax indujo un alto nivel de apoptosis en las células HeLa, lo que impidió obtener líneas estables. Por este motivo se decidió usar estos mismos vectores para realizar transfecciones transitorias. El método elegido fue el mismo que para los ensayos de Complementación Bimolecular

de Fluorescencia (apartado 3.3.1), utilizando las siguientes cantidades: ratios de 1  $\mu$ g DNA plasmídico : 3  $\mu$ l Lipofectamina 2000 y 300 ng de vector por cada  $10^5$  células.

### **3.3.4 Dilución límite para obtención de líneas estables.**

Cuando el objetivo fue obtener líneas estables que tuvieran un nivel de sobreexpresión homogéneo de la proteína de interés se llevó a cabo una dilución límite que permitiera la elección de un clon concreto de células.

En 30 ml de medio DMEM condicionado (medio de cultivo completo de la misma línea celular después de 24h de crecimiento, filtrado) se sembraron 150 células (en determinados casos previa selección con puromicina), en 3 placas de 96 pocillos de fondo plano con 100  $\mu$ l por pocillo. De esta manera se consigue que en algunos pocillos quede una sola célula que podrá comenzar a dividirse gracias a los factores de crecimiento y citoquinas que contiene el medio condicionado.

Tras unas 3 semanas, se comenzaron a seleccionar algunos clones concretos a los que se añadió más medio completo y que se fueron expandiendo a pocillos de mayor tamaño. En el caso de células infectadas con proteínas fluorescentes se seleccionaron aquellos pocillos en los que había células fluorescentes. Los clones que fueron proliferando, se sembraron a placas de pocillos de mayor tamaño hasta obtenerse una cantidad suficiente de cultivo como para analizar la sobreexpresión de las proteínas de interés mediante Western-Blot (apartado 3.8). Los clones de la línea infectada con el vector pBABE vacío se seleccionaron al azar y se comprobó que no existiera sobreexpresión de las proteínas Mcl-1 y/o Bcl-X<sub>L</sub>.

Los clones elegidos y denominados HeLa-Vector, HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> se expandieron y utilizaron posteriormente para los experimentos de Complementación Bimolecular de Fluorescencia. Por otro lado los clones que sobreexpresaban las proteínas de fusión fluorescente Mcl-1-EYFP, EYFP-Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP y EYFP-Bcl-X<sub>L</sub> se emplearon para determinar las localizaciones de las proteínas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> mediante microscopía confocal de fluorescencia (apartado 3.5).

### **3.4 CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS)**

#### **3.4.1 Análisis de las interacciones entre proteínas por BiFC.**

Después de 24 horas de haber transfectado las líneas celulares con las parejas de vectores pBiFC (apartado 3.3.1), se procedió a cuantificar las interacciones mediante citometría de flujo. Para ello las células se tripsinizaron, se lavaron en PBS y se analizaron en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Las señales de las proteínas Venus (generada por la complementación de sus dos fragmentos e indicativo de interacción entre las proteínas a las que los fragmentos se encuentran fusionados) y mRFP se cuantificaron utilizando los láseres de excitación 488 nm y 635 nm, respectivamente. Se aplicó un proceso de “gating” en el cual se excluían las células no transfectadas, consideradas como aquellas que no presentaban fluorescencia roja. De esta manera se calculó el porcentaje de células verdes respecto a las rojas, dándonos así una relación de las células en las que está ocurriendo interacción entre las proteínas de estudio, dentro de las células que han sido transfectadas. Además, también se calculó la relación de las intensidades de fluorescencia media (Fluorescencia media Venus/ Fluorescencia media mRFP), obteniéndose un índice de la intensidad de esta interacción.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Weasel (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia).

#### **3.4.2 Análisis de las interacciones entre proteínas por BiFC Multicolor.**

Transcurridas 24 horas desde la transfección de las células con las diferentes combinaciones de vectores se estudió la formación diferencial de complejos fluorescentes mediante citometría de flujo. Para este análisis se empleó un citómetro de flujo Gallios de Beckman Coulter. Este citómetro permite emplear el láser de 405 nm para excitar los complejos que contienen el fluoróforo de la proteína Cerulean, que tiene su máximo de excitación a 434 nm. De esta manera podemos realizar simultáneamente una adquisición de la fluorescencia de los complejos de la proteína Venus y del marcador de transfección mRFP.

### 3.4.3 Determinación de potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y translocación de fosfatidilserina.

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) generado por el gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, es alto y de alrededor de 130 mV en las células en condiciones normales. Sin embargo, su disminución debido a la despolarización de las mitocondrias es un evento temprano del proceso apoptótico. Otro evento que caracteriza la apoptosis es la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, lo cual conduce a la fagocitosis de esa célula por parte de macrófagos.

Para determinar el potencial mitocondrial se utilizaron las sondas lipofílicas DiOC<sub>6</sub>(3) (ioduro de 3,3'-dihexiloxa carbocianina, fluorescencia verde) o TMRE (Tetrametildrodamina etiléster, fluorescencia roja) (Molecular Probes, Invitrogen), que se acumulan en la matriz de las células viables, y que conforme disminuye el potencial mitocondrial desciende la cantidad de sonda retenida y consecuentemente la fluorescencia emitida.

Para la medida de exposición de fosfatidilserina se empleó Anexina V (Immunostep), proteína que se une específicamente a este fosfolípido, conjugada a ficoeritrina (PE, fluorescencia roja) o isocianato de fluoresceína (FITC, fluorescencia verde).

Para realizar el marcaje de Anexina V, las células se recogieron, se lavaron en PBS y se incubaron con 0,5  $\mu$ g/ml de la Anexina V conjugada con el fluorocromo adecuado en 100  $\mu$ l de tampón ABB (Annexin Binding Buffer: Hepes 10 mM, Sigma; NaOH 10 mM, Merck; CaCl<sub>2</sub> 140 mM, Merck; NaCl 2,5 mM, Merck) durante 15 minutos en oscuridad. Para analizar simultáneamente el potencial mitocondrial, a la mezcla anterior se añadió bien 5 nM DiOC<sub>6</sub>(3) o 60 nM de TMRE y se incubó entonces durante 15 minutos a 37 °C.

Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur de BD Biosciences y el tratamiento de los datos se realizó con el programa Weasel.

### **3.5 LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA**

Para el estudio de la localización de proteínas mediante su marcaje intracelular con anticuerpos, por visualización directa de complejos formados por BiFC o por sobreexpresión de una proteína fusionada a proteínas fluorescentes se empleó la técnica de microscopía confocal de fluorescencia.

La visualización de las diferentes preparaciones se realizó en un microscopio confocal Leica SP2 AOBS. Las imágenes se recogieron empleando el modo secuencial, para garantizar que no hubiera interferencia entre las diferentes fluorescencias utilizadas. Se utilizó un objetivo de inmersión de 63x (HCXPLAPO NA 1.40; Leica). La adquisición de imágenes se realizó con un "line average" de 16, un formato de 1024X1024 pixeles y la apertura confocal fue de una unidad de Airy. Las imágenes se analizaron con Leica Confocal Software y se exportaron a Adobe PhotoShop CS2 v.p.

Para determinadas aplicaciones se empleó el microscopio confocal Olympus FV10i. La adquisición de imágenes se realizó en modo secuencial con un objetivo de 60x (Plan S-APO 60xO, NA 1.35), un "line average" de 8 y un formato de 1024x1024 pixels. La apertura confocal fue de una unidad de Airy. El análisis de imágenes se realizó con el software FV10-ASW 2.0 Viewer y se exportaron a Adobe PhotoShop CS2 v.p.

#### **3.5.1 Inmunolocalización de proteínas intracelulares.**

Por una parte se llevó a cabo la detección de la salida de citocromo c de las mitocondrias al espacio intermembrana mitocondrial ocasionada por la inducción de apoptosis al transfectar las células con los vectores pBiFC. Por otra parte se estudió la localización de las proteínas Bax y Mcl-1 endógenas. Para ello se sembraron  $5 \times 10^4$  células en un volumen final de 500  $\mu$ l de medio en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de 13 mm de diámetro. Tras 24 horas de la transfección con los vectores pBiFC o de la siembra para la localización de Bax/Mcl-1 se procedió al inmunomarcaje de las diferentes proteínas.

El primer paso fue el lavado de las células con PBS para su posterior fijado en paraformaldehído (Merck) al 4% durante 15 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo

se retiró el paraformaldehído y las células se volvieron a lavar con PBS. A continuación, se sacaron los cubreobjetos de los pocillos y se lavaron consecutivamente en: Saponina (Merck) al 0,1% en PBS, PBS y H<sub>2</sub>O MilliQ. A continuación, los cubres se colocaron en una cámara húmeda que consistió en un recipiente de plástico con el fondo cubierto de papel de filtro humedecido en agua destilada y una capa de parafilm. Sobre el parafilm se colocaron gotas de 20 µl de la mezcla del anticuerpo correspondiente (190 µl de saponina al 0,1% de PBS y 10 µl de suero de cabra con la dilución adecuada para cada anticuerpo). De esta manera se colocaron los cubreobjetos encima de las gotas con la cara con las células adheridas en contacto con la dilución de anticuerpo, y se incubó durante una hora. Una vez terminada la primera incubación, se volvieron a lavar los cubreobjetos en las tres soluciones anteriormente indicadas. A continuación se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario adecuado (dilución 1/1000 en una mezcla que contenía 190 µl de saponina al 0,1% de PBS y 10 µl de suero de cabra) durante una hora. Pasado este tiempo, se lavaron de nuevo los cubreobjetos en las soluciones de Saponina 0,1% en PBS, PBS y agua MilliQ y, una vez secos se colocaron en un portaobjetos sobre una gota de Fluoromount-G (SouthernBiotech) que contenía 20 µM de DRAQ5 (Molecular Probes, Invitrogen) para el marcaje de núcleos. La conservación de las preparaciones se realizó a 4°C.

Los anticuerpos primarios empleados en cada caso se recogen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Especie	Dilución de uso	Casa comercial
<b>Citocromo c</b>	mc, ratón	1/1000	BD Biosciences, 556432
<b>Mcl-1</b>	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz, sc-819
<b>Bax</b>	pc, conejo	1/1000	BD Biosciences, 13666E

**Tabla 3.6 Relación de anticuerpos primarios empleados para marcaje intracelular.**

De forma paralela se realizó el marcaje con la misma cantidad de IgG de ratón del isotipo correspondiente (IgG<sub>1</sub>) o IgG de conejo, para valorar la especificidad de señal de fluorescencia del marcaje con los anticuerpos primarios.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón conjugado con Alexa 568 (Invitrogen) en el caso del marcaje de citocromo c y anti-conejo conjugado con Alexa 488 (Invitrogen) para el marcaje de Mcl-1 y Bax.

### **3.5.2 Visualización de los complejos formados por BiFC.**

Se empleó la técnica de microscopía confocal para visualizar la localización de los complejos entre las proteínas correspondientes al transfectar las células con las diferentes combinaciones de vectores de BiFC. Para ello, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $10^5$  células/ml y sobre cubres de 13mm de diámetro previamente sumergidos en etanol y secos. Tras 24 horas las células fueron transfectadas como se describe anteriormente (apartado 3.3.1) y 24 horas después de la transfección se procedió a la tinción de sus mitocondrias con la sonda MitoTracker Red (50 nM, Invitrogen). Tras 15 minutos a 37°C se pasó a fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se lavaron con PBS y agua MilliQ. Una vez secos los cubreobjetos, éstos se colocaron sobre un portaobjetos que contenía una gota de Fluoromount-G (SouthernBiotech) con 20  $\mu$ M de DRAQ5 (Molecular Probes, Invitrogen) para el marcaje de núcleos. Las preparaciones se conservaron a 4°C hasta su visualización.

### **3.6 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR POR TINCIÓN CON HOECHST 33342.**

Para el análisis de la morfología nuclear tras el inmunomarcaje de las diferentes líneas celulares se empleó el reactivo Hoechst 33342 a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml (dilución en PBS del stock de 20 mg/ml). La visualización de las preparaciones se realizó con un microscopio de fluorescencia confocal Olympus FV10i con las condiciones descritas anteriormente.

### **3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA TIME-LAPSE.**

Para realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de la formación de los complejos entre proteínas por BiFC así como para ver la sobreexpresión de una proteína de fusión fluorescente tras transfectar las células, se empleó un microscopio de fluorescencia multidimensional Leica AF6000 LX system. Este microscopio tiene acoplada una cámara termostatazada que permite mantener las células en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se visualizan con un objetivo seco de 40 aumentos (HCX PL S-APO 40.0x0.75) y las imágenes se adquieren a intervalos regulares con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) de alta resolución. El software de análisis LAS AF (Leica), permite el montaje de las imágenes adquiridas en forma de vídeo.

Para estos estudios las células HeLa, HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> se sembraron en microplacas de 8 pocillos de Ibidi. En cada pocillo se sembraron  $2 \times 10^4$  células en un volumen final de 200  $\mu$ l de medio DMEM 10% SFB sin antibiótico. Las transfecciones correspondientes con los vectores pBiFC o retrovirales se llevaron a cabo directamente en estas placas. Tras la transfección se introdujeron las placas en la cámara termostatazada del microscopio para proceder a la elección de los diferentes planos de visualización.

### **3.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

#### **3.8.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales.**

Tras someter a las células a diferentes tratamientos o transfecciones, se recogieron  $5 \times 10^5$  células y se lavaron con 1ml de PBS. Posteriormente, se les añadió 10  $\mu$ l de tampón de lisis 1X para la extracción de proteínas citoplasmáticas (Triton-X-100 al 1%, Sigma; NaCl 150 mM, Merck; Tris/HCl 50 mM pH 7,6, Sigma; glicerol 10% v/v, Scharlau; EDTA 1 mM, Sigma; ortovanadato sódico 1 mM, Sigma; pirofosfato sódico 10 mM, Sigma; leupeptina 10  $\mu$ g/ml, Sigma; fluoruro de sodio 10 mM, Sigma; fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, Sigma) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. A continuación, los lisados se centrifugaron 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo sobre el que se añadió 5  $\mu$ l de tampón de carga 3X (Tris/HCl 150 mM pH 7,4, Sigma; 3% dodecilsulfato de sodio, SDS, Merck; molibdato de Sodio 0,3 mM, Sigma; pirofosfato de sodio 30 mM, Sigma; fluoruro de sodio 30 mM, Sigma; glicerol 30% v/v, Scharlau; 2- $\beta$ -mercaptoetanol 30% v/v, Sigma; azul de bromofenol 0,06% p/v). Estos lisados celulares se calentaron a 100°C durante 5 minutos en un baño seco (Selecta) para ser cargados en los geles de electroforesis o bien fueron conservados a -20°C para su uso posterior.

En determinados casos se realizó un análisis de proteínas totales, incluyendo las nucleares, se utilizó otro tampón de lisis cuya composición era: 2% SDS, Merck; 20 mM Tris/HCl pH 6,6, Sigma. En este caso los lisados se hirvieron durante 20 minutos a 100°C antes de ser cargados en los geles de electroforesis.

### 3.8.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

La separación de proteínas celulares en función de su peso molecular se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida con un 0,1% de SDS. El porcentaje de acrilamida varió entre el 10-15% según el tamaño de las proteínas a analizar. Las composiciones del gel concentrador o “stacking” y separador o “resolving” se encuentran en la siguiente tabla:

Reactivos	Gel concentrador	Gel separador (X%)
30% Acrilamida/Bisacrilamida (Bio Rad)	0,65 ml	0,33X ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,26 ml	/
Tris-HCl 3 M pH 8,8	/	2,5 ml
Persulfato amónico (Sigma)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Merck)	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3 ml	7,35-0,33X ml
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TMED) (Sigma)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabla 3.7 Composición química de los geles de electroforesis.**

Las electroforesis se realizaron en cubetas de Hoefer miniVE (GE Healthcare) con 1 litro de tampón de electroforesis (Trizma 19mM, Sigma; glicina 1.9, Panreac; 0,01% SDS, Merck). Una vez hervidos, los extractos celulares se centrifugaron 60 segundos a 12.000 rpm a temperatura ambiente antes de cargarlos en el gel concentrador. Se cargaron 5  $\mu$ l de marcadores de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 180V durante 2-3 horas.

### 3.8.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C-extra, GE Healthcare) según el método descrito previamente ((Talanian et al. 1997). La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (Bio Rad) a 20 V y 400 mA durante 55 minutos en tampón de transferencia (Tris/HCl 48mM pH 8,3, Sigma; glicina 39 mM, Sigma; 0,0373% SDS, Merck; 20% metanol grado HPLC, Panreac). La eficacia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con Rojo Ponceau (0,1% en acético al 5%, Merk).

### 3.8.4 Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia (Western Blotting) y detección de los inmunocomplejos.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas celulares fijadas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCl 10mM pH 8, Sigma; NaCl 0,12 M, Sigma; Tween-20 0,1%, Sigma; timerosal, Merck 0,1 g/L) durante unos 30 minutos.

La detección de proteínas concretas se realizó con la ayuda de anticuerpos específicos y los marcadores de pesos moleculares coloreados sirvieron para calcular los pesos moleculares relativos de las proteínas detectadas.

La incubación con el anticuerpo primario específico (Tabla 3.7) se realizó en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo, a una concentración y tiempo de incubación determinado para cada anticuerpo utilizado (Tabla 3.7). Tras esta incubación, se realizaron tres lavados de 15 minutos en agitación con tampón B. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa o fosfatasa alcalina (ambos de Sigma) a una dilución de 1/20.000 en la misma disolución de tampón B al 2% de leche desnatada en polvo. La incubación con el anticuerpo secundario se mantuvo durante 1-2 horas a temperatura ambiente y en agitación, tras lo cual se realizaron tres nuevos lavados de 15 minutos con tampón B para eliminar exceso de anticuerpos.

Anticuerpo	Especie	Dilución de uso	Casa comercial
<b>Bim</b>	pc, conejo	1/1000	Calbiochem
<b>Mcl-1</b>	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz, sc-819
<b>Bak</b>	pc, conejo	1/1000	Millipore
<b>Bak</b>	pc, conejo	1/1000	Santa Cruz, sc-832
<b>Bax</b>	pc, conejo	1/1000	BD Biosciences
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	pc, conejo	1/1000	Cell Signalling
<b>Noxa</b>	mc, ratón	1/250	Abcam
<b>PUMA</b>	pc, conejo	1/500	Cell Signalling
<b>α-Tubulina</b>	mc, ratón	1/5000	Sigma

Tabla 3.8 Relación de anticuerpos primarios empleados para Western-Blotting.

La detección de los complejos se llevó a cabo mediante revelado por quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación de un sustrato quimioluminiscente por parte de la peroxidasa. Esta luz fue captada por películas fotográficas (High performance chemiluminescence film, GE HealthCare) en oscuridad y previa incubación de las membranas con Immobilon Western Reagent (Millipore) durante 90 segundos. Los tiempos de exposición de la película a la membrana variaron desde unos segundos hasta varios minutos dependiendo del anticuerpo. La exposición de las películas se llevó a cabo dentro de un cassette de revelado radiológico (Hypercassette™, Amersham Bioscience) y en un cuarto oscuro con iluminación adecuada para revelado fotográfico. Las películas se revelaron, tras la exposición, mediante inmersión en soluciones de revelador - agua destilada - fijador, variando el tiempo en solución de revelador según la señal obtenida. La preparación de las soluciones de revelador (Sigma) y fijador (Kodak) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.**

El análisis estadístico de la significancia de los datos se realizó mediante el cálculo de la t-Student, empleando el programa GraphPad Prism 4.0. (GrandPath Software, Inc., San Diego, CA, USA).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



#### 4.1 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA TÉCNICA BiFC

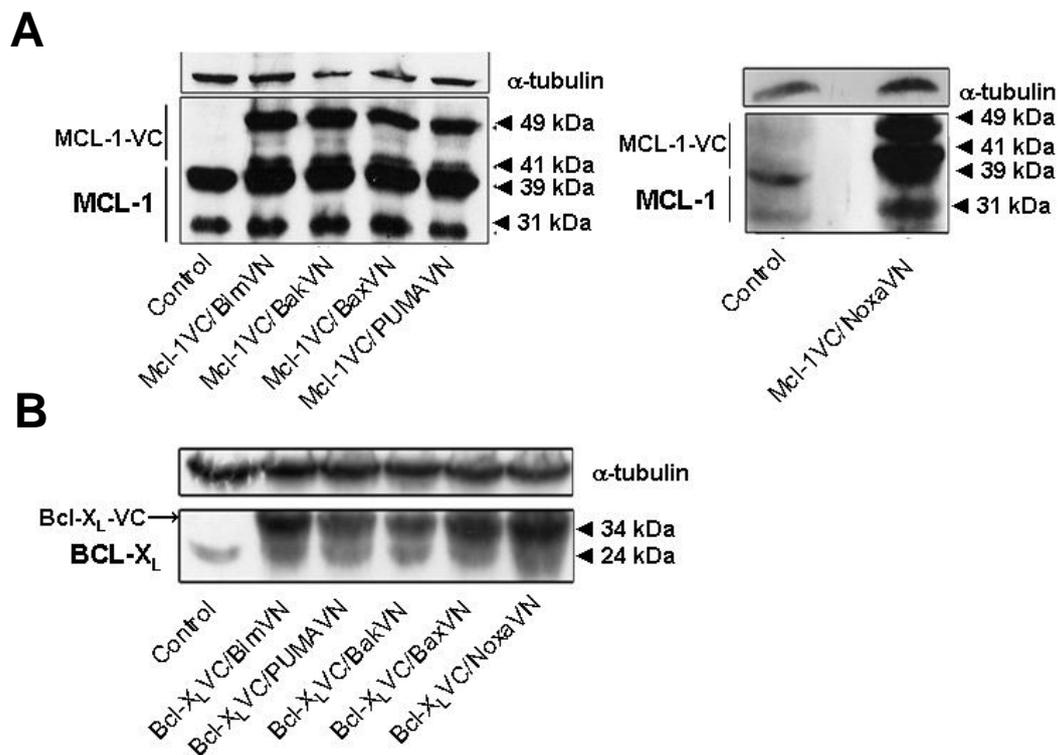
El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha tenido como objetivo principal el estudio de las interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 mediante la técnica Complementación Bimolecular de Fluorescencia, BiFC. Para lograr este objetivo la etapa inicial fue la puesta a punto de dicha técnica aplicada a las proteínas de la **familia Bcl-2**. La técnica se describe ampliamente en la Introducción (apartado 2.5.2.3) y los detalles de la construcción de los vectores así como del método de transfección de células pueden encontrarse en los apartados 3.2.7 y 3.3.1 de Materiales y Métodos.

Como primer paso para evaluar la aplicabilidad de la técnica a las proteínas de la **familia Bcl-2** se estudió la interacción de Mcl-1 con Bim, ampliamente aceptada en la bibliografía (Gomez-Bougie et al. 2004; Erlacher et al. 2005; Gomez-Bougie et al. 2005; Lopez-Royuela et al. 2009). En este paso se determinó también la cantidad óptima de vectores a transfectar. Así, se pudo encontrar el ratio de DNA plasmídico que era necesario transfectar en las células de manera que se pudieran detectar los complejos mediante citometría de flujo y visualizarlos por microscopía. A la vez, se intentó minimizar la señal correspondiente a ruido de fondo y de interacciones no específicas que se obtendría con niveles de expresión demasiado elevados. De esta manera, se encontró que lo más adecuado para cumplir ambos requisitos era transfectar 300 ng de cada vector por cada  $10^5$  células. Como se ha mencionado anteriormente en el apartado 3.3.1 de Materiales y Métodos, cuando se transfectó simultáneamente con dos proteínas proapoptóticas añadió previamente zVAD ( $50\mu\text{M}$ ) para preservar la integridad de las células y poder visualizar los complejos formados. En esos casos se redujo la cantidad de vectores transfectados la mitad (150 ng de cada vector por cada  $10^5$  células).

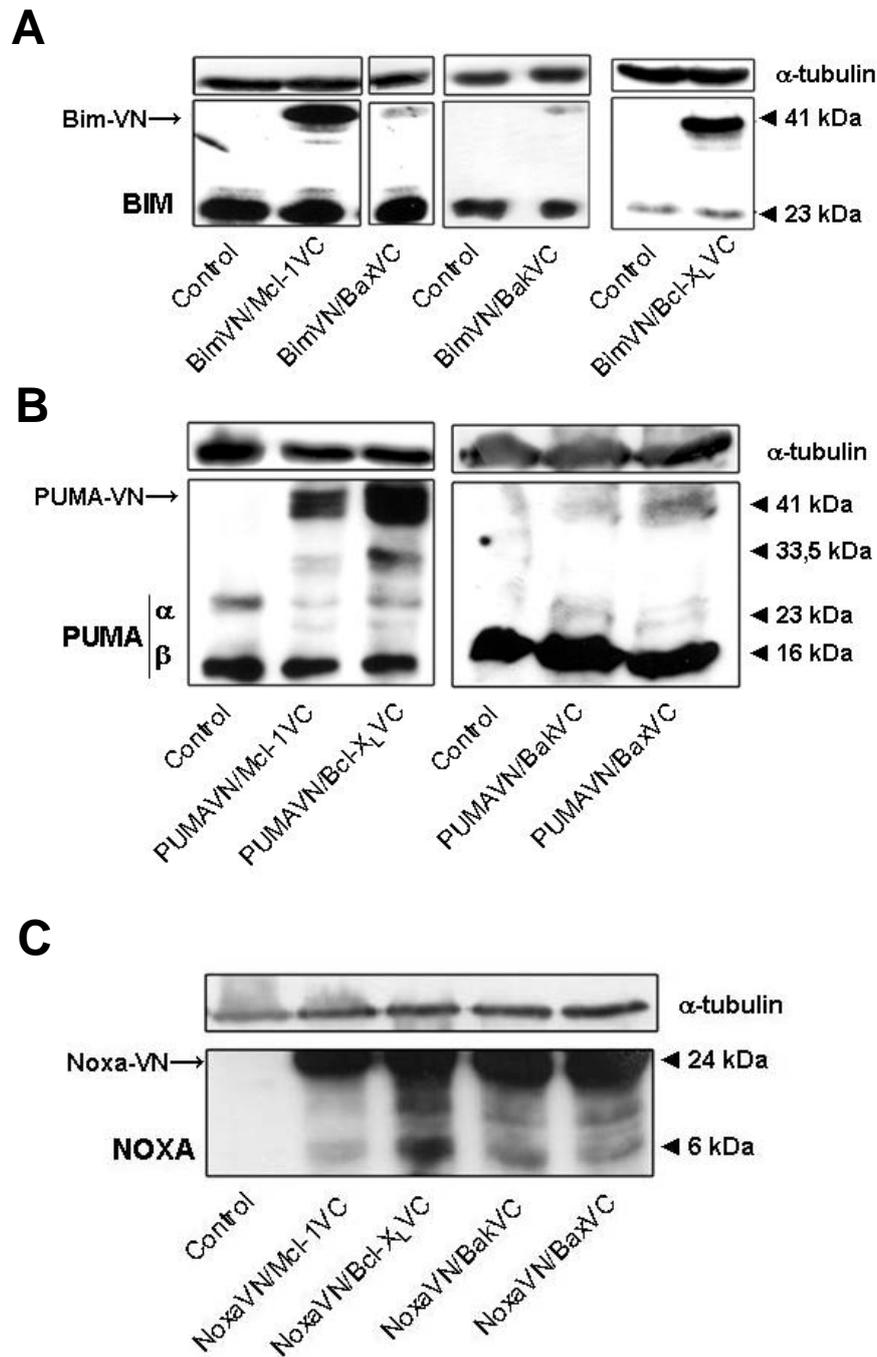
Es importante mencionar que en todos los experimentos los niveles de transfección han sido muy similares para las diferentes interacciones estudiadas. Éstos se han determinado por la fluorescencia emitida por la proteína roja mRFP codificada en un tercer vector que se añade en la mezcla de transfección, Los porcentajes de transfección han oscilado en todos los casos entre unos valores de 35-55%.

#### 4.1.1 Análisis de los niveles de expresión de las proteínas de fusión.

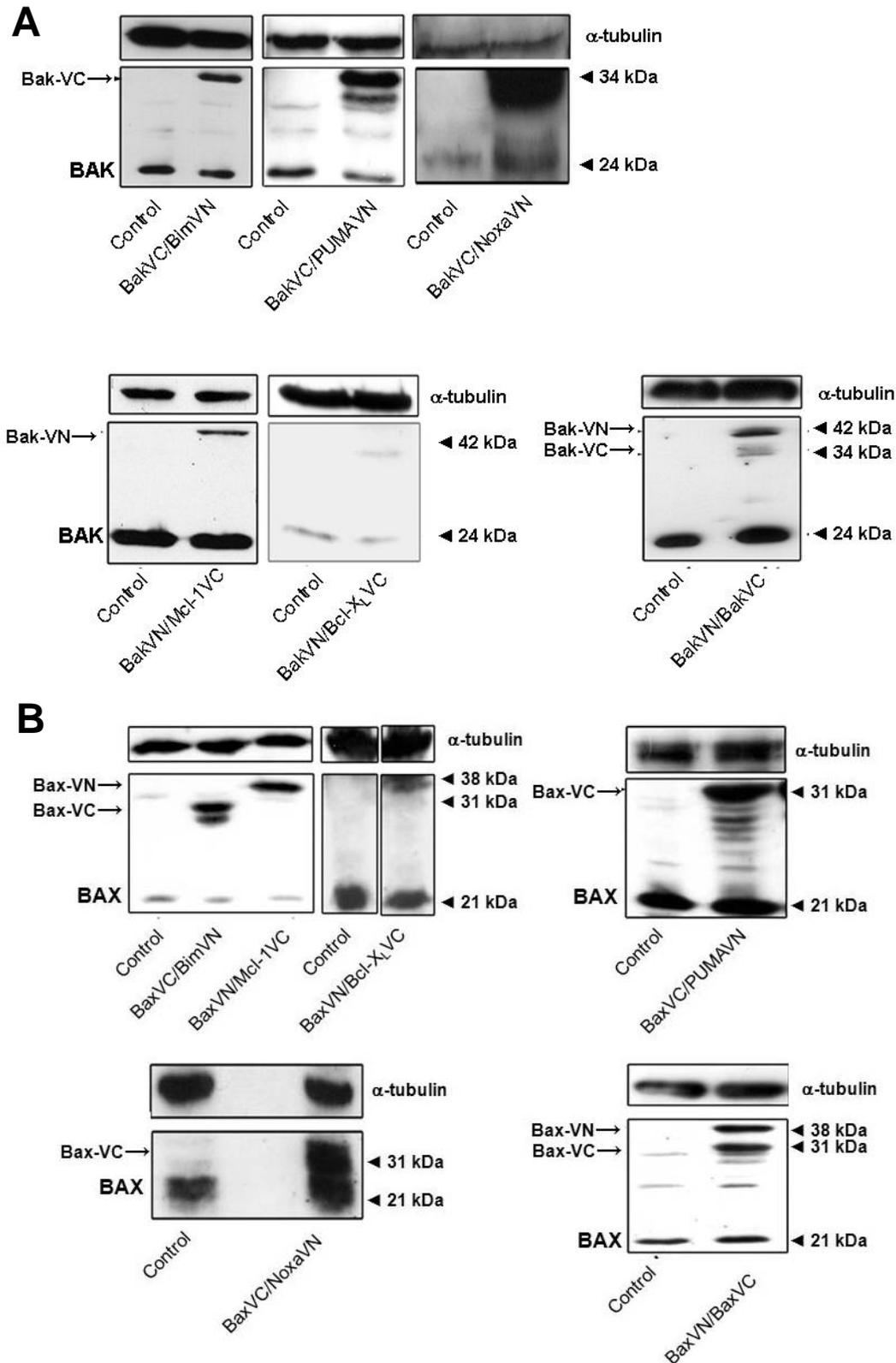
Como ya se ha mencionado en alguna ocasión anteriormente un objetivo importante a la hora de optimizar los parámetros para llevar a cabo la técnica BiFC es que los niveles de expresión de las proteínas de fusión no excedan sobremanera los de las proteínas endógenas. De esta manera se puede garantizar que las interacciones detectadas no son consecuencia de una sobreexpresión demasiado elevada. Las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 muestran los niveles de expresión alcanzados para cada proteína de fusión al transfectarla con diferentes parejas objeto de estudio, en todos los casos empleando el primer conjunto de vectores (ver Figura 3.2). Los pesos moleculares de las proteínas de fusión se indican en cada panel y corresponden a la suma del peso del fragmento de la proteína fluorescente y el peso de la proteína endógena.



**Figura 4.1 Niveles de expresión de las proteínas de fusión Mcl-1-VC (A) y Bcl-X<sub>L</sub> (B) analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas.** El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VC~10,5 kDa).

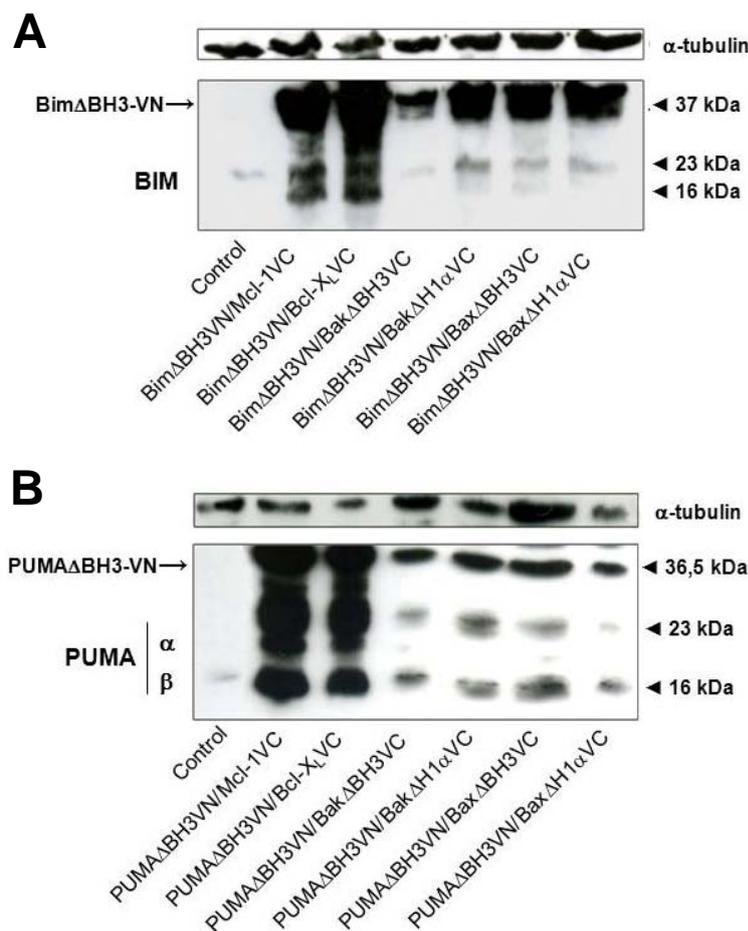


**Figura 4.2 Niveles de expresión de las proteínas de fusión Bim-VN (A), PUMA-VN (B) y Noxa-VN (C) analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas. El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN~17,5 kDa).**

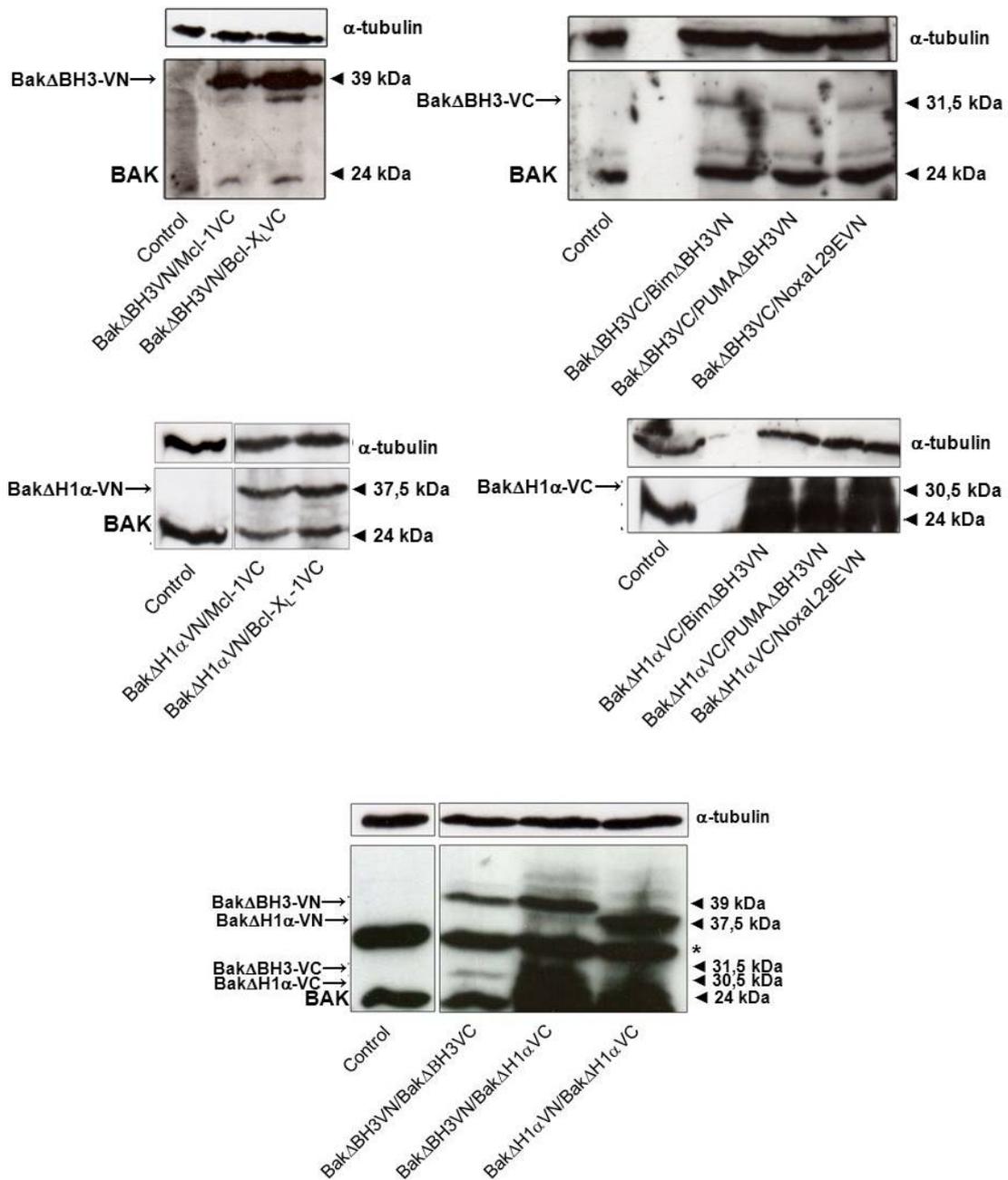


**Figura 4.3 Niveles de expresión de las proteínas de fusión Bak-VN y Bak-VC (A) y Bax-VN y Bax-VC (B) analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas. El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN~17,5 KDa; VC~10,5 KDa).**

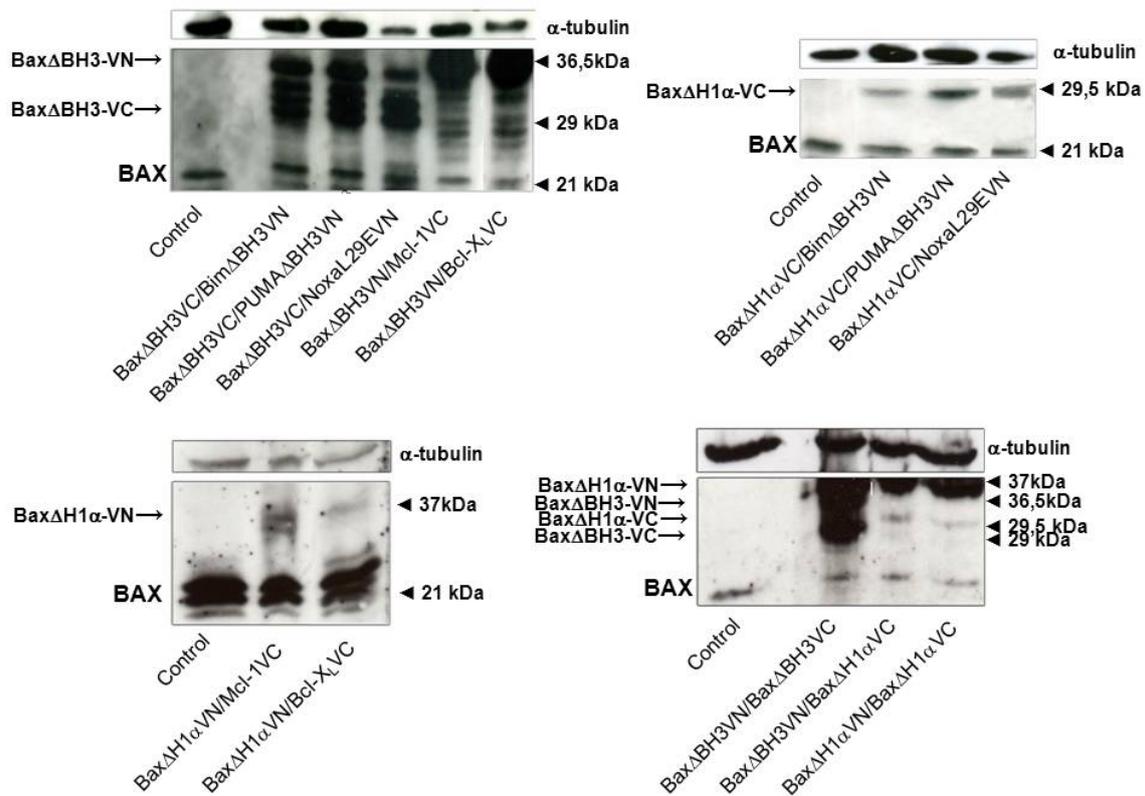
También se analizó la expresión de las proteínas de fusión delecionadas para verificar que eran capaces de expresarse en las células y que las variaciones en las interacciones que detectamos por BiFC no son consecuencia de una expresión anómala (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6). Los western-blot presentados corresponden como en la figura anterior a la transfección con las diferentes parejas de proteínas de fusión correspondientes al primer conjunto de vectores (Figura 3.2). En las transfecciones de dos proteínas proapoptóticas se trataron las células previamente con zVAD-fmk (50 $\mu$ M) y se redujo la cantidad de vectores transfectados a la mitad (1,5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células de cada vector), con el fin de evitar la sobreexpresión de dichas proteínas.



**Figura 4.4 Niveles de expresión de las proteínas de fusión mutantes Bim $\Delta$ BH3-VN (A) y PUMA $\Delta$ BH3-VN (B) analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas.** El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN ~ 17,5 KDa; VC ~ 10,5 KDa).



**Figura 4.5 Niveles de expresión de las proteínas de fusión mutantes Bak $\Delta$ BH3-VN/VC y Bak $\Delta$ H1 $\alpha$ -VN/VC analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas.** El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN ~ 17,5 KDa; VC ~ 10,5 KDa). La banda marcada con un \* corresponde a una banda inespecífica que reconoce el anticuerpo empleado (Santa Cruz, ver Tabla 3.8).



**Figura 4.6 Niveles de expresión de las proteínas de fusión mutantes BaxΔBH3-VN/VC y BaxΔH1α-VN/VC analizados por western-blot, respecto a las proteínas endógenas.** El peso molecular de las proteínas de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN ~ 17,5 KDa; VC ~ 10,5 KDa).

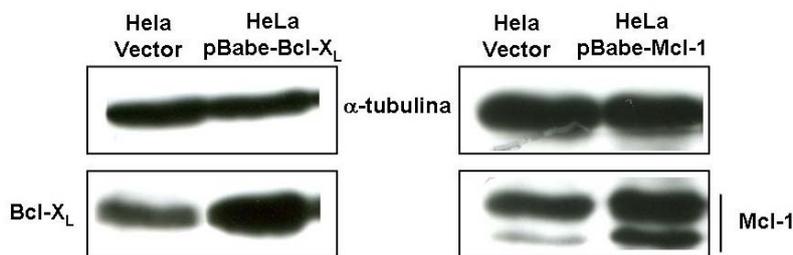
#### 4.1.2 Verificación de la funcionalidad de las proteínas de fusión

Una cuestión importante a destacar es el hecho de que fusionar una proteína fluorescente, o un fragmento de ésta, a otra proteína puede alterar de alguna manera su localización y funcionalidad. Una característica de las proteínas de la familia Bcl-2 es su estrecha relación con las membranas mitocondriales a la hora de ejercer su función en la ruta intrínseca de la apoptosis (Lindsay et al. 2010). Por ello, se analizó si fusión de fragmentos de la proteína Venus necesaria para los ensayos de BiFC podría estar influyendo en la localización y función de las proteínas cuya interacción se quería estudiar.

En primer lugar se decidió comprobar que las proteínas proapoptóticas al ser transfectadas eran capaces de inducir muerte en las células. Para tener un control con

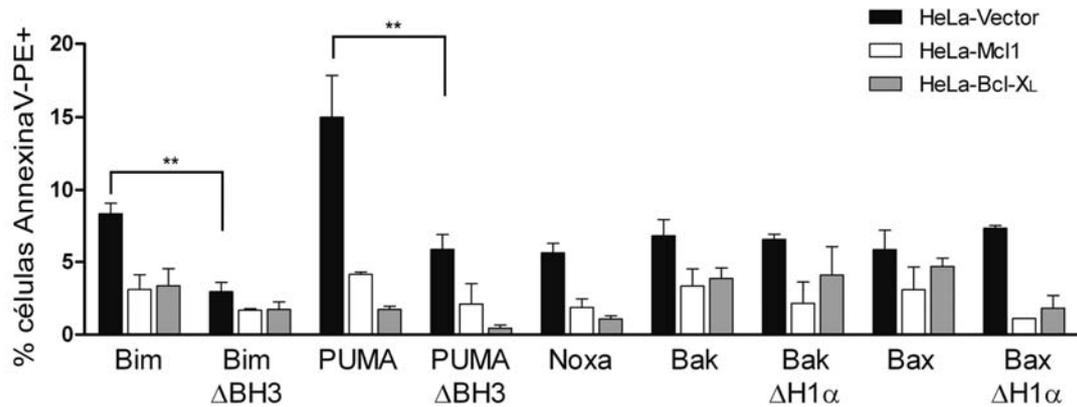
el que comparar se generaron dos líneas estables que sobreexpresaran las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>, respectivamente. La obtención de estas líneas se llevó a cabo por infección retroviral como se describe en el apartado 3.3.3 con los vectores pBabe-Mcl-1, pBabe-Bcl-X<sub>L</sub> y pBabe vacío.

Para verificar la sobreexpresión de ambas proteínas de fusión se seleccionaron varios clones, por la resistencia a puromicina codificada en el vector, y se analizaron sus niveles de expresión por western-blot. En la Figura 4.7 se puede observar un aumento de la expresión de las proteínas de interés en los clones seleccionados, respecto a la línea con el vector pBabe vacío (HeLa-Vector).



**Figura 4.7 Niveles de expresión de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> en las líneas HeLa-Vector y las dos sublíneas obtenidas por infección retroviral.**

A continuación se estudió la inducción de apoptosis por parte de las proteínas proapoptóticas y la protección que las sublíneas generadas ofrecían (Figura 4.8). Se midió la exposición de fosfatidilserina por citometría de flujo por unión de AnnexinaV-PE y se pudo observar que, efectivamente, la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> protege de manera importante a la muerte inducida por sobreexpresión transitoria de las proteínas de fusión proapoptóticas.



**Figura 4.8 Datos de la muerte celular inducida a las 24h de la transfección con proteínas proapoptóticas, analizada por exposición de fosfatidilserina por citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de 3-4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Cabe mencionar que se observa una disminución en el porcentaje de células apoptóticas al transfectar con las proteínas “sólo-BH3” Bim y PUMA carentes de sus dominios BH3. Estos datos parecen indicar que las proteínas de fusión que generamos eran funcionales al ser transfectadas a las células.

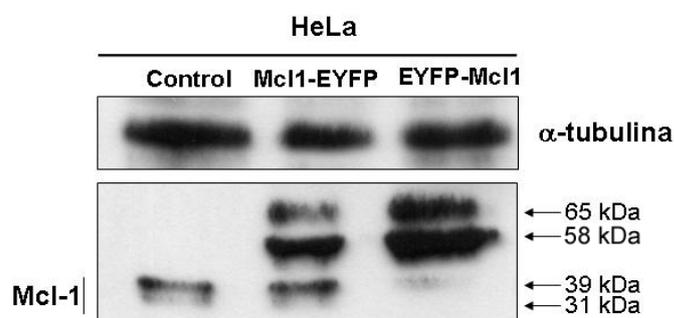
#### 4.1.3 Efecto de la generación de fusiones sobre la localización y función de las proteínas.

La función de las proteínas de la familia Bcl-2 en la ruta intrínseca de la apoptosis está vinculada a las mitocondrias y a su localización en la membrana externa de dichos orgánulos. La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el DNA nuclear y se transportan a la mitocondria después de traducirse (Neupert 1997). Muchas de las proteínas localizadas en la membrana mitocondrial externa (MME) tienen una señal de localización interna que no se procesa tras el transporte de dichas proteínas (Setoguchi et al. 2006). Según su topología, las proteínas de la MME se dividen en dos clases: las que están ancladas a la membrana a través de un segmento transmembrana localizado en su extremo N-terminal (proteínas N-TA) y las que tienen el sitio de anclaje en el extremo C-terminal (proteínas C-TA) y exponen su extremo N-terminal hidrofílico al citoplasma (Setoguchi et al. 2006). El segmento transmembrana de hidrofobicidad moderada y las secuencias ricas en aminoácidos básicos que lo flanquean funcionan como señales para dirigir y distribuir a las proteínas N y C-TA en las mitocondrias (Rapaport 2003).

Los vectores utilizados inicialmente para generar las proteínas de fusión para los estudios de interacciones por la técnica BiFC tienen, por defecto, la fusión del fragmento de la proteína fluorescente Venus en el extremo carboxilo de la proteína de interés. Según lo explicado en el párrafo anterior, y dependiendo de a qué clase de proteínas mitocondriales pertenezcan, esto podría alterar la localización y función de las proteínas de la familia Bcl-2. Por ello, nos planteamos analizar si la fusión de una proteína en el extremo carboxilo de algunas de las proteínas objeto de estudio podía afectar su funcionalidad.

#### 4.1.3.1 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Mcl-1.

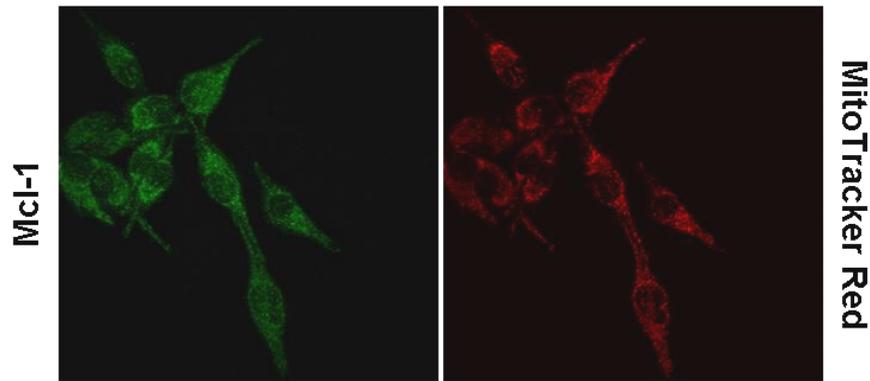
Por un lado quisimos verificar que la fusión del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus en el extremo carboxilo de Mcl-1 estaba afectando a su localización subcelular. Para ello generamos, mediante la técnica PCR solapada (apartado 3.2.7.2), dos constructos de la proteína Mcl-1 con la proteína fluorescente EYFP fusionada en su extremo amino (EYFP-Mcl-1) y en su extremo carboxilo (Mcl-1-EYFP), respectivamente. Estos constructos se clonaron en el vector pBabe y posteriormente se obtuvieron, por infección retroviral de la línea celular HeLa, dos líneas estables que sobreexpresaban las proteínas de fusión fluorescentes (Figura 4.9).



**Figura 4.9 Análisis mediante western-blot de la sobreexpresión estable de las proteínas de fusión Mcl-1-EYFP y EYFP-Mcl-1 en células HeLa.** El peso molecular de la proteína sobreexpresada corresponde con el peso teórico calculado mediante la herramienta informática Expassy. El carril marcado como Control corresponde a la línea HeLa-CN, obtenida mediante la transfección estable con el vector pBabe vacío. Peso molecular EYFP ~ 27kDa.

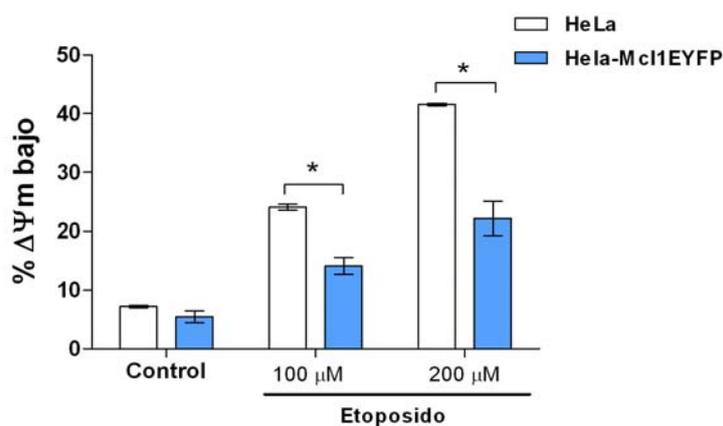
Una vez obtenidas estas líneas derivadas de HeLa se estudió la localización subcelular de ambas proteínas de fusión por microscopía confocal (apartado 3.5). Como se puede apreciar en la Figura 4.10 ambas proteínas presentan un patrón de localización muy similar y se detectan tanto en citoplasma como en mitocondrias,





**Figura 4.11 Inmunolocalización de Mcl-1 en las células HeLa.** Se realizó un marcaje intracelular de la proteína Mcl-1 y en paralelo se hizo otro marcaje con IgG de conejo para descartar la fluorescencia inespecífica, ambos con Alexa 488. Simultáneamente se visualizaron las mitocondrias utilizando la sonda MitoTracker Red.

Asimismo analizamos el efecto de la fusión en el extremo C-terminal de Mcl-1 sobre su papel protector frente a estímulos apoptóticos. Para ello, la línea estable HeLa-Mcl-1-EYFP fue sometida al tratamiento con dos dosis de etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II con potente efecto citotóxico sobre diferentes neoplasias (Lock and Stribinskiene 1996) y comparada con la línea control (Figura 4.12). Se puede observar que la sobreexpresión de la proteína Mcl-1 no bloquea de forma total la muerte inducida por este fármaco aunque sí la reduce significativamente.



**Figura 4.12 Análisis de la muerte celular inducida por etopósido en las líneas celulares HeLa y HeLa-Mcl-1-EYFP tras 24 horas de tratamiento.** La apoptosis se cuantificó analizando la caída de potencial mitocondrial con la sonda fluorescente TMRE. Los resultados son media  $\pm$  SD de 2 experimentos independientes. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

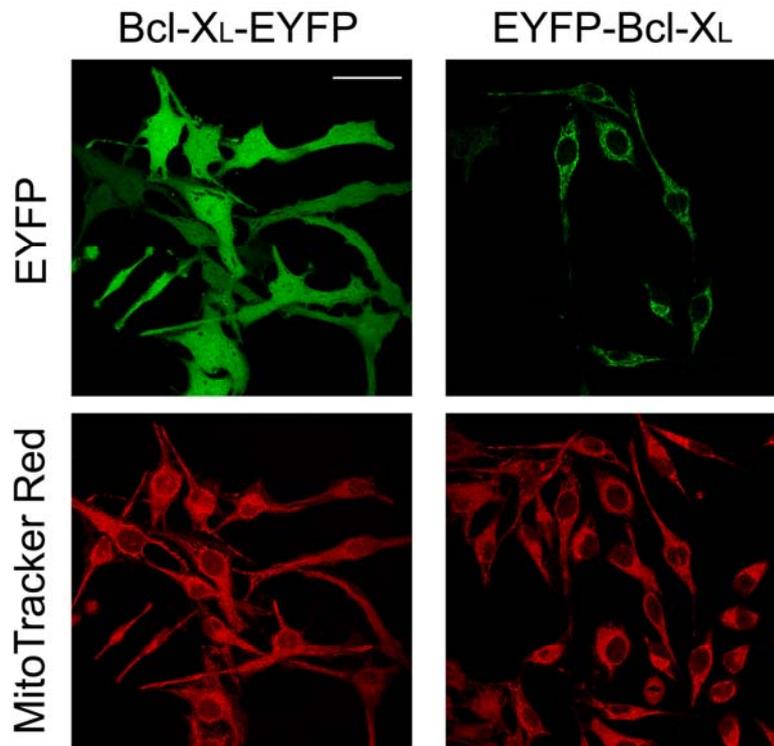
Todos los datos obtenidos anteriormente ponen en evidencia que la fusión de una proteína en el extremo carboxilo de Mcl-1 genera una proteína quimera funcional y que su localización subcelular no se ve alterada respecto a la proteína endógena. La proteína de fusión de Mcl-1 empleada para los estudios de interacciones por la técnica BiFC fue en todos los casos la que presenta el fragmento de la proteína Venus en su extremo carboxilo.

#### 4.1.3.2 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Bcl-X<sub>L</sub>.

La proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> está en algunos modelos celulares inicialmente asociada a las mitocondrias (Gonzalez-Garcia et al. 1994) aunque otros autores han descrito que se localiza en citosol y se transloca a las mitocondrias al recibir un estímulo apoptótico (Hsu et al. 1997; Cuttle et al. 2001). El extremo C-terminal de Bcl-X<sub>L</sub>, constituido por una secuencia de 21 aminoácidos, forma una hélice hidrofóbica que, junto a una serie de residuos básicos que la flanquean, funciona como dominio de inserción en la MME (Kaufmann et al. 2003). Otros posibles dominios transmembrana se han localizado en la hélice  $\alpha$  5 de esta proteína (Garcia-Saez et al. 2004) y algunos estudios de mutagénesis dirigida muestran que la horquilla formada por las hélices  $\alpha$  5 y 6 de Bcl-X<sub>L</sub> es importante para su capacidad de formar poros iónicos *in vitro* (Schendel et al. 1997) y para su actividad antiapoptótica (Matsuyama et al. 1998). Además otros autores han sugerido la existencia de una conformación alternativa de Bcl-X<sub>L</sub> anclada a la membrana a través de su dominio N-terminal (Thuduppathy et al. 2006). Se ha observado también, que en el citosol de células sanas Bcl-X<sub>L</sub> se encuentra formando homodímeros mediante la inserción de su dominio C-terminal en el bolsillo hidrofóbico que forman las regiones BH1-BH3 de otra molécula de Bcl-X<sub>L</sub> (Jeong et al. 2004). Sin embargo, datos de cristalografía de rayos X han demostrado que los bolsillos hidrofóbicos de las moléculas de Bcl-X<sub>L</sub> implicadas en la formación de dímeros están accesible para la unión de dominios BH3 (O'Neill et al. 2006).

Como en el caso de Mcl-1, quisimos ver si la fusión de una proteína en el extremo C-terminal de Bcl-X<sub>L</sub> afectaba a la localización subcelular de esta proteína. Para ello generamos dos líneas estables derivadas de HeLa mediante infección retroviral con los vectores pBabe- Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP y pBabe-EYFP-Bcl-X<sub>L</sub>. Al observar ambas líneas celulares por microscopía confocal se comprobó que la posición de la proteína fluorescente respecto a Bcl-X<sub>L</sub> alteraba la localización de ésta de manera importante (Figura 4.13). Mientras que la proteína Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP presentaba una

localización totalmente citosólica, la distribución de EYFP- Bcl-X<sub>L</sub> era completamente mitocondrial.



**Figura 4.13** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se puede observar la distribución subcelular de las proteínas de fusión Bcl-X<sub>L</sub>-EYFP y EYFP-Bcl-X<sub>L</sub> en células HeLa. Escala, 50  $\mu$ m.

Esta clara diferencia nos hizo plantearnos que quizás las interacciones que pudiéramos detectar mediante BiFC empleando la proteína de fusión con el fragmento de Venus en el C-terminal de Bcl-X<sub>L</sub> podrían tener una localización errónea. Por ello, como se explica más adelante, decidimos estudiar las interacciones de Bcl-X<sub>L</sub> con el resto de miembros de la familia utilizando dos constructos diferentes, con el fragmento de la proteína fluorescente Venus fusionado a uno u otro extremo de Bcl-X<sub>L</sub>.

#### 4.1.3.3 Influencia de la fusión en el extremo carboxilo de Bax.

Bax es una proteína principalmente citosólica en células sanas que se transloca a las mitocondrias al darse un estímulo apoptótico (Wolter et al. 1997; Goping et al. 1998). Existe mucha controversia acerca de los dominios que dirigen a Bax a las membranas mitocondriales y promueven su inserción en éstas (Lalier et al. 2007). Por

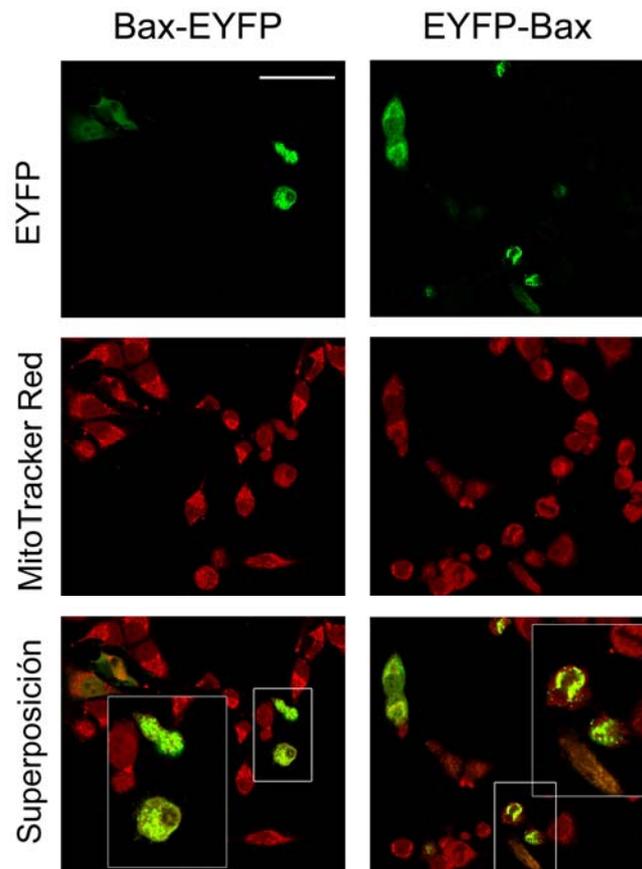
su homología con Bcl-2, inicialmente se propuso que Bax se insertara en las mitocondrias a través de su hélice  $\alpha 9$  en el extremo C-terminal (Nechushtan et al. 1999) y causara la liberación de citocromo c (Eskes et al. 1998; Lewis et al. 1998). Además, se ha sugerido un papel fundamental del residuo Pro168 en la localización de Bax, controlando el cambio conformacional que hace salir la hélice 9 del bolsillo hidrofóbico, donde se encuentra en la forma inactiva de la proteína (Schinzel et al. 2004). Por otra parte, se ha descrito que la secuencia localizada en el extremo N-terminal de la proteína, correspondiente a los primeros 20 residuos de ésta, es la responsable de la retención de Bax en el citosol en ausencia de una señal apoptótica (Goping et al. 1998). Esta secuencia se ha denominado ART (del inglés "apoptosis-regulating targeting") y contiene un motivo PRGGGP de gran movilidad, según datos de RMN (Suzuki et al. 2000). Recientemente se ha descrito que el extremo C-terminal de Bax pueda actuar como una segunda secuencia ART, más que como dominio de localización mitocondrial (Tremblais et al. 1999; Arokium et al. 2004) y que son los aminoácidos 20-37 de Bax, que corresponden a la primera hélice  $\alpha$  de la proteína, los que contienen la señal de importación a la mitocondria (Cartron et al. 2003; Er et al. 2006). Éstos y otros autores han sugerido también que las hélices 5 y 6 de Bax son las que se insertan en la membrana externa mitocondrial y que pueden tener un papel importante en la interacción con proteínas antiapoptóticas (Nouraini et al. 2000; Garcia-Saez et al. 2004; Heimlich et al. 2004; Cartron et al. 2005). De hecho, trabajos de mutagénesis dirigida mostraron que estas dos hélices de Bax actuaban como dominios transmembrana y estaban implicados en la formación de poros en la MME (Nouraini et al. 2000; Annis et al. 2005), siendo capaces de insertarse en membranas lipídicas sintéticas y de formar poros en éstas (Schendel et al. 1998; Garcia-Saez et al. 2006).

Un trabajo más reciente ha seguido aportando datos controvertidos acerca de las funciones de los diferentes dominios de Bax (Valentijn et al. 2008), planteando la posibilidad de que Bax se transloque a la mitocondria mediante dos procesos consecutivos. Por una parte, en este trabajo se sugiere de nuevo que la secuencia de inserción en la membrana se localice en el C-terminal de Bax y que una vez se encuentran moléculas de Bax funcionales en la membrana mitocondrial externa, éstas puedan reclutar a más moléculas hacia la membrana independientemente de la presencia de la señal de importación. De esta manera, la existencia de una segunda ola de reclutamiento de más moléculas de Bax hacia la mitocondria explicaría que la delección de 22 aminoácidos del dominio C-terminal de Bax no bloquee el reclutamiento de dicha proteína a las mitocondrias, como observan Cartron y colaboradores (Cartron

et al. 2002). Finalmente, un estudio publicado recientemente ha mostrado que el dominio C-terminal de Bax funciona como señal de direccionamiento a la mitocondria pero solamente en presencia del dominio N-terminal de la proteína (Brock et al. 2010). El modelo que describen estos autores está de acuerdo con lo propuesto anteriormente por Andrews y colaboradores (Yethon et al. 2003; Leber et al. 2007). Así, sugieren que Bax sea inicialmente direccionado a la MME por una señal probablemente localizada en el extremo N-terminal; que a continuación haya una asociación de la proteína con la membrana por inserción de la hélice C-terminal hidrofóbica, lo cual causaría un cambio conformacional mayor que llevaría a la integración final de las hélices 5 y 6 en la membrana lipídica.

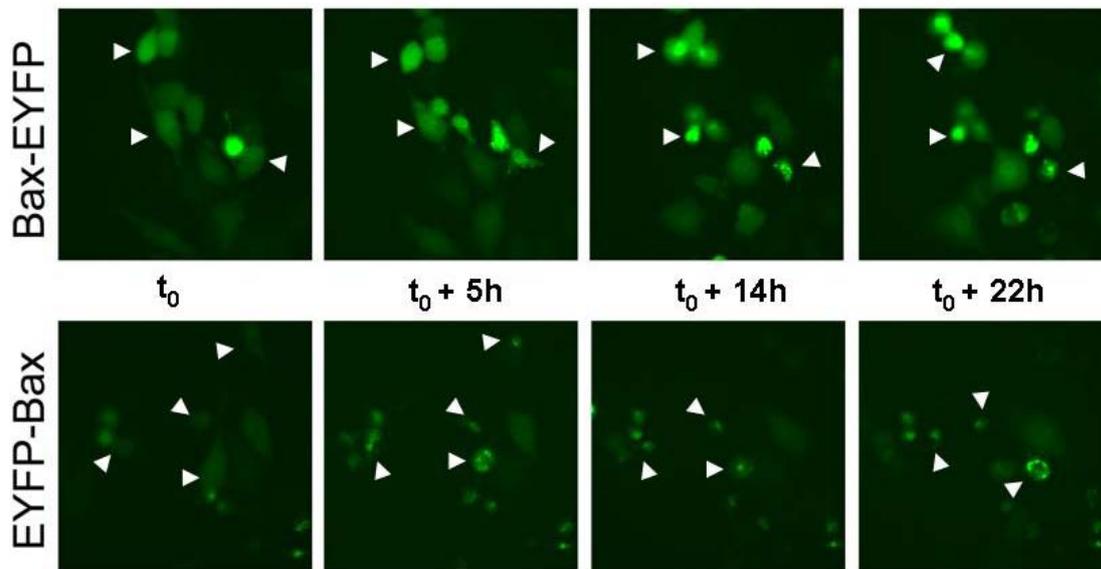
Respecto a las proteínas de fusión que hemos generado a partir de Bax quisimos estudiar la localización subcelular que presentaban así como su capacidad de inducir apoptosis y de translocarse a las mitocondrias. Para ello se generaron dos nuevos constructos en el vector pBabe de Bax con la proteína fluorescente EYFP en ambos extremos de la primera (Bax-EYFP y EYFP-Bax) (apartado 3.2.8.3). Debido a que la sobreexpresión de la proteína Bax inducía un alto nivel de apoptosis y nos impidió obtener líneas estables derivadas de HeLa, se decidió emplear la sobreexpresión transitoria con los constructos Bax-EYFP y EYFP-Bax.

Se analizó por un lado la distribución de ambas proteínas de fusión por microscopía confocal de fluorescencia al ser transfectadas en células HeLa con Lipofectamina. Las fotografías de la Figura 4.14 muestran que en ambos casos la proteína de fusión de Bax presenta localización citosólica en células con morfología de célula sana y parcialmente mitocondrial en aquellas células que parecen tener un fenotipo apoptótico.



**Figura 4.14** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se puede observar la distribución subcelular de las proteínas de fusión Bax-EYFP y EYFP-Bax en células HeLa. Escala, 50  $\mu\text{m}$ .

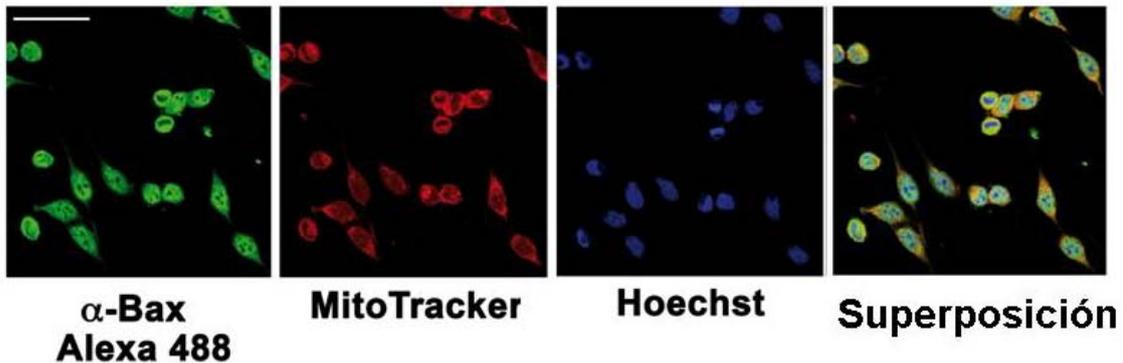
A continuación se analizó cómo se producía la translocación de ambas proteínas de fusión (Bax-EYFP y EYFP-Bax) a las mitocondrias. Para ello se transfectaron las células HeLa con los vectores que contenían las proteínas de fusión y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia time-lapse. Se realizó una adquisición de imágenes de planos concretos a intervalos regulares durante 24 horas. En la Figura 4.15 se muestran imágenes representativas a diferentes tiempos tras la transfección. Como se puede observar, la fluorescencia emitida por ambas proteínas de fusión tiene un patrón difuso en el citosol de las células y parece puntearse cuando las células adquieren morfología apoptótica. Cabe destacar que la proteína de fusión con el extremo carboxilo de Bax libre (EYFP-Bax) parece que induce muerte en más cantidad de células y se transloca al citosol más rápidamente. No obstante, Bax-EYFP también es perfectamente capaz de realizar dicha translocación en las células y de provocar la muerte de éstas, incluso en ausencia de un estímulo apoptótico externo.



**Figura 4.15** Secuencia de fotografías de microscopía de fluorescencia time-lapse adquiridas en microscopio Leica AF6000 LX con una cámara CCD de alta resolución. Se muestra la habilidad de las proteínas de fusión Bax-EYFP y EYFP-Bax de translocarse del citosol a las mitocondrias de células HeLa.

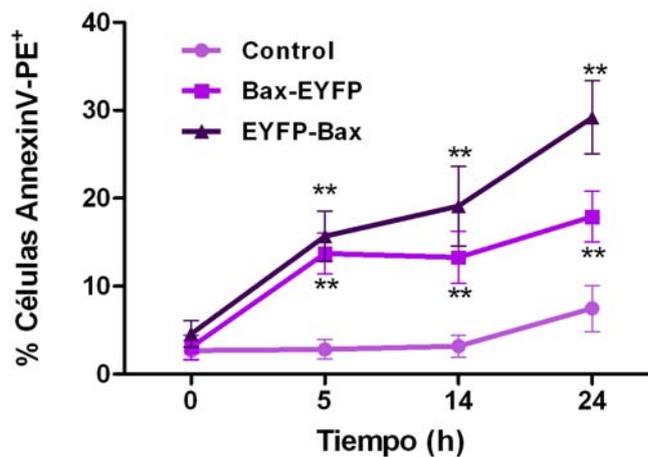
Los resultados obtenidos con el constructo de Bax que tiene la proteína fluorescente fusionada en su extremo carboxilo, Bax-EYFP, discrepan parcialmente con los resultados publicados por otros autores anteriormente. En el trabajo de Valentijn y colaboradores observan que la proteína Bax-GFP es incapaz de translocarse a las mitocondrias en fibroblastos de ratón dobles knockout para Bak/Bax tras un inducir anoikis en tiempos cortos (Valentijn et al. 2008). No obstante, sí observan esta translocación a tiempos largos, cuando las células ya presentan núcleos apoptóticos. Además, en otro estudio en el que emplean diferentes mutantes de delección de Bax con la GFP fusionada en su extremo C-terminal sí observan un patrón punteado de la fluorescencia y por fraccionamiento subcelular detectan este Bax en citosol y en mitocondrias (Parikh et al. 2007). En otro trabajo reciente se descarta que el dominio C-terminal de Bax sea el determinante para la translocación hacia la mitocondria (Brock et al. 2010). Estos autores defienden que es necesaria la presencia del dominio N-terminal de la proteína y que el mutante (Bax $\Delta$ C) está conformacionalmente activo sin necesidad de inducirse la apoptosis. Es posible que la fusión de una proteína en el extremo C-terminal de Bax cause este mismo efecto, de manera que tendremos una proteína Bax-EYFP constitutivamente activa, pero que en este caso sí es capaz de translocarse a la mitocondria (Figura 4.15).

A continuación, se llevó a cabo un marcaje intracelular de la proteína Bax mediante anticuerpos específicos y se observaron las células en el microscopio confocal. Como se aprecia en la Figura 4.16 la distribución de Bax en células HeLa parece ser citosólica, incluso con presencia en el núcleo de las células, salvo de aquellas que se encuentran en proceso de división. Estas observaciones están en concordancia con lo descrito anteriormente en otro trabajo (Hoetelmans et al. 2000).



**Figura 4.16 Inmunolocalización de Bax en células HeLa.** Se realizó un marcaje intracelular de la proteína Bax y en paralelo se hizo otro marcaje con IgG de conejo para descartar la fluorescencia inespecífica, ambos conjugados con Alexa 488. Simultáneamente se visualizaron las mitocondrias utilizando la sonda MitoTracker Red y los núcleos con la sonda Hoechst 33342. Escala, 50  $\mu\text{m}$ .

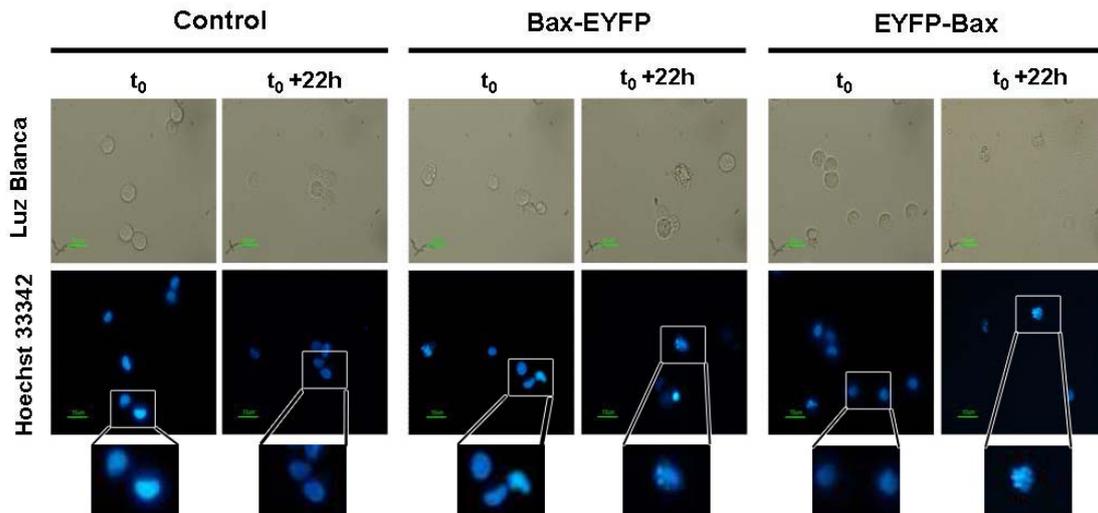
Finalmente, para comprobar de manera más exacta la capacidad de estas proteínas de inducir muerte por apoptosis al ser sobreexpresadas transitoriamente en células HeLa, se analizó la exposición de fosfatidilserina mediante citometría de flujo a los mismos tiempos mostrados en las fotografías de la Figura 4.15. Como se observa en la gráfica de la Figura 4.17 ambas proteínas provocan la exposición de fosfatidilserina, indicada como el porcentaje de células con marcaje positivo para Anexina-V-PE, en un porcentaje significativamente mayor de células cuando se compara con la transfección de un vector control sin inserto.



**Figura 4.17** Análisis de la apoptosis inducida en la línea celular HeLa por transfección transitoria con las proteínas de fusión Bax-EYFP y EYFP-Bax y comparación con el vector control. El tiempo 0 corresponde al momento de la transfección. Los resultados son media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Es importante mencionar que nuestros resultados contradicen parcialmente los de otros trabajos en los que observan que la fusión de una proteína en el extremo C-terminal de Bax provoca altos niveles de muerte celular (Priault et al. 2003; Yivgi-Ohana et al. 2011). En nuestros experimentos la proteína EYFP-Bax provoca más muerte por apoptosis al ser transfectado en las células y además, en la secuencia de fotografías de microscopía time-lapse (Figura 4.15) se puede observar que ésta se dirige más rápidamente a las mitocondrias (patrón punteado en las células) y aumenta el número de células con morfología apoptótica, respecto a cuando se transfectan con Bax-EYFP.

De las mismas muestras recogidas para analizar por citometría de flujo, se tomó una pequeña alícuota para analizar el fenotipo de los núcleos de las células transfectadas con las proteínas de fusión y el vector control. Las imágenes de la Figura 4.18 son representativas del experimento. Se muestran solamente imágenes correspondientes al tiempo de inicio y final del experimento, donde se aprecia claramente la aparición de núcleos apoptóticos al transfectar las células con Bax-EYFP y EYFP-Bax, no así en el caso del vector control.



**Figura 4.18 Análisis de la morfología nuclear tras la transfección con las proteínas de fusión de Bax mediante tinción con Hoechst 33342 (1000X). Imágenes representativas de diferentes planos.**

Después de realizar las comprobaciones anteriores, podemos afirmar que las proteínas de fusión generadas a partir de Bax para los experimentos de estudio de interacciones mediante BiFC presentan una localización subcelular normal y son funcionales en cuanto a su capacidad de inducir apoptosis en las células y de realizar la translocación del citosol a las mitocondrias.

## **4.2 INTERACCIONES DE LAS PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS Mcl-1 Y Bcl-X<sub>L</sub> CON MIEMBROS PROAPOPTÓTICOS DE LA FAMILIA Bcl-2.**

Como se ha mencionado en el apartado 2.4.1 de la Introducción, uno de los puntos discrepantes entre el modelo directo y el indirecto es el mecanismo por el cual las proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> ejercen el bloqueo de las proteínas proapoptóticas multidominio Bak y Bax. Por una parte, según el modelo indirecto de activación, las proteínas antiapoptóticas interactúan directamente con Bak y Bax evitando así la permeabilización de las mitocondrias (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Por otra parte, se sabe que en determinadas células sanas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> interactúan con gran afinidad con proteínas proapoptóticas “sólo-BH3”, como Bim y PUMA (Chen et al. 2005; Gomez-Bougie et al. 2005) y también Noxa (Zhang et al. 2011). Sin embargo, determinados estímulos apoptóticos, como los glucocorticoides, hacen aumentar los niveles de proteínas como Bim y PUMA, excediendo la capacidad

de las proteínas antiapoptóticas de bloquear dichas proteínas “sólo-BH3”. De esta manera quedarán libres moléculas de proteínas proapoptóticas “sólo-BH3” que podrán llevar a cabo la activación de Bak y Bax para proseguir con la ruta intrínseca de la apoptosis (Erlacher et al. 2005; Lopez-Royuela et al. 2009; Lopez-Royuela et al. 2012).

Con el objetivo de analizar la capacidad de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> para bloquear las proteínas Bak y Bax o bien para neutralizar a las proteínas “sólo-BH3” que pudieran activar a las anteriores, se estudiaron las interacciones que estas dos proteínas antiapoptóticas establecen con uno y otro subgrupo de proteínas mediante BiFC.

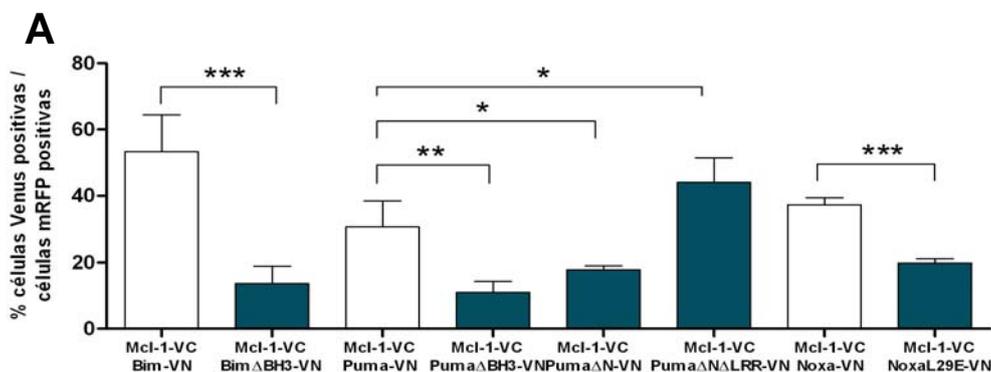
#### **4.2.1. Interacciones de la proteína antiapoptótica Mcl-1 con proteínas proapoptóticas “sólo-BH3” y con las proteínas multidominio Bak y Bax.**

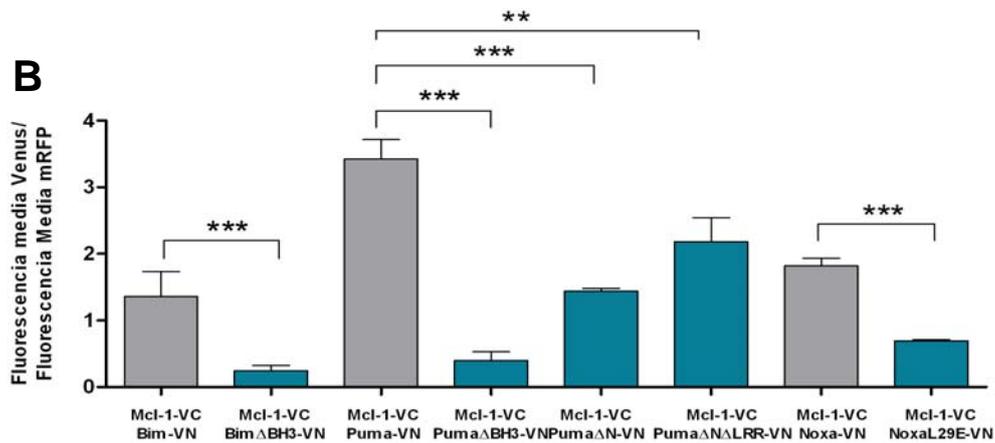
Las células HeLa se cotransfectaron (apartado 3.3.1) con cantidades equivalentes de dos vectores, uno que codifica Mcl-1 fusionada al fragmento carboxilo de la proteína fluorescente Venus (Mcl-1-VC) y otro que contiene el fragmento amino de dicha proteína fluorescente fusionado a Bim (Bim-VN), PUMA (PUMA-VN), Noxa (Noxa-VN), Bak (Bak-VN) o Bax (Bax-VN). A las 24 horas de la transfección, las células se recogieron para su análisis mediante citometría de flujo. También se estudiaron los complejos formados por microscopía confocal de fluorescencia. Asimismo, se estudiaron algunas de las interacciones intercambiando el fragmento de la proteína Venus al que se encuentran fusionadas nuestras proteínas.

Se ha descrito que las proteínas “sólo-BH3” establecen interacciones con el resto de proteínas de la familia Bcl-2 mediante su dominio BH3, insertándolo en un bolsillo hidrofóbico que forman los dominios BH1-BH3 de las segundas (Liu et al. 2003). Además, se ha observado que la delección del dominio BH3 de Bim (Puthalakath et al. 1999) y de PUMA (Nakano and Vousden 2001; Yu et al. 2001) bloquea la acción proapoptótica de estas proteínas. Por esta razón, analizamos también la interacción de Mcl-1 con los mutantes de las proteínas Bim y PUMA cuyo dominio BH3 fue delecionado mediante técnicas de PCR solapada (apartado 3.2.7.2) (Bim $\Delta$ BH3 y PUMA $\Delta$ BH3). Por otra parte, se estudió también esta interacción con el mutante de Noxa en el que se realizó una sustitución de la leucina 29, perteneciente al dominio BH3 de la proteína, por un ácido glutámico (NoxaL29E).

Nuestros datos indican que Mcl-1 es capaz de interactuar con las tres proteínas “sólo-BH3” analizadas en un porcentaje elevado de células, respecto a las células que han sido efectivamente transfectadas (Figura 4.19 A). Por otra parte, el cálculo del ratio de la intensidad media de fluorescencia de los complejos formados por BiFC respecto de la intensidad media de fluorescencia emitida por la mRFP (Figura 4.19 B) muestra que la interacción de Mcl-1 con las proteínas “sólo-BH3” resulta en valores mayores que las interacciones con Bax o Bak (Figura 4.23). Esto sugiere que Mcl-1 podría estar principalmente implicado en la neutralización de proteínas “sólo-BH3”. La gran afinidad de Mcl-1 por las tres proteínas “sólo-BH3” estudiadas ya se había descrito anteriormente por otras técnicas (Cory et al. 2003), pero no en células intactas.

Cuando deletamos el dominio BH3 de Bim y PUMA la interacción de éstas con Mcl-1 disminuye significativamente, tanto en el porcentaje de células que presentan complejos fluorescentes, como en la intensidad de fluorescencia que emitida por estos complejos (Figura 4.19). La mutación del aminoácido Leucina 29 de Noxa por un ácido glutámico, que modifica la secuencia de su dominio BH3, también causa una reducción importante en su interacción con Mcl-1. Estos resultados indican que el dominio BH3 de las proteínas “sólo-BH3” juega un papel esencial en las interacciones establecidas entre los miembros de esta familia. Por otra parte, la reducción de las interacciones cuando modificamos la superficie de interacción entre estas proteínas nos permite verificar que las interacciones que observamos entre Mcl-1 y las proteínas “sólo-BH3” silvestres son específicas. Es importante mencionar que las proteínas mutantes de delección de Bim y PUMA se expresaron correctamente y a niveles equivalentes a las proteínas silvestres cuando son transfectadas con Mcl-1 (Figura 4.4 A y B).



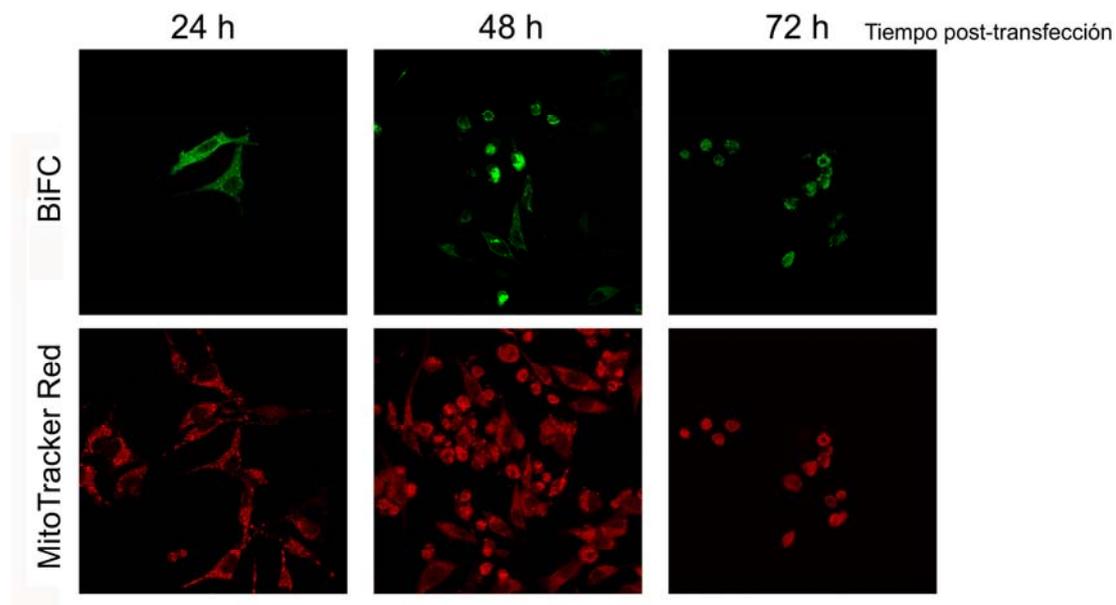


**Figura 4.19 Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Mcl-1 y las proteínas proapoptóticas Bim, PUMA y Noxa y sus respectivos mutantes de delección o mutación puntual.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

El análisis de la estructura tridimensional de varios dominios BH3 en complejo con proteínas antiapoptóticas ha revelado la especial importancia de 4 residuos conservados en el motivo BH3 para dicha interacción (Liu et al. 2003; Lee et al. 2008), siendo dos de ellos los aminoácidos Leucina y Aspártico que establecen contactos hidrofóbicos e interacciones por puente salino respectivamente con otros residuos conservados de las proteínas “tipo-Bcl-2” (Lanave et al. 2004; Day et al. 2005; Hinds and Day 2005). Como ya se ha mencionado anteriormente, la mutación puntual del residuo leucina 29 de Noxa, perteneciente a su dominio BH3, a un residuo ácido como es el ácido aspártico hace disminuir mucho su interacción con Mcl-1 (figura 4.19 A y B). Este dato concuerda con lo publicado por Lee y colaboradores, que observan que solamente la sustitución de la leucina conservada en el dominio BH3 de Bim por un aminoácido ácido hace disminuir sustancialmente la afinidad por Mcl-1 (Lee et al. 2007).

Por otra parte, datos estructurales y de mutagénesis presentados en trabajos anteriores han demostrado que la unión de Bim y PUMA mediante su dominio BH3 al bolsillo hidrofóbico de Mcl-1 causa la estabilización de dicha proteína antiapoptótica (Mei et al. 2005; Czabotar et al. 2007). Sin embargo, la unión de Noxa a Mcl-1 promueve la ubiquitinación de la última y su degradación vía proteasoma (Willis and Adams 2005a; Czabotar et al. 2007). Dicha diferencia entre estas proteínas BH3 radica en la distinta composición de aminoácidos del dominio BH3. Se intentó

visualizar esta degradación de Mcl-1 al unirse a Noxa mediante microscopía confocal a diferentes tiempos después de la transfección. Como se observa en la Figura 4.20 a las 24 horas de transfectar las células los complejos de Noxa y Mcl-1 tienen una localización mitocondrial (ver también fotografía de Figura 4.22) y la morfología de las células es normal. Conforme pasa el tiempo las células que presentan fluorescencia presentan una morfología más redondeada, y esta fluorescencia parece disminuir en intensidad. Es probable que esté ocurriendo la degradación de este complejo, no solamente de la proteína Mcl-1, ya que los complejos formados por BiFC son esencialmente irreversibles (Kerppola 2008).



**Figura 4.20** Fotografías de microscopía confocal de fluorescencia de los complejos formados por la pareja de proteínas Mcl-1 y Noxa a diferentes tiempos después de la transfección.

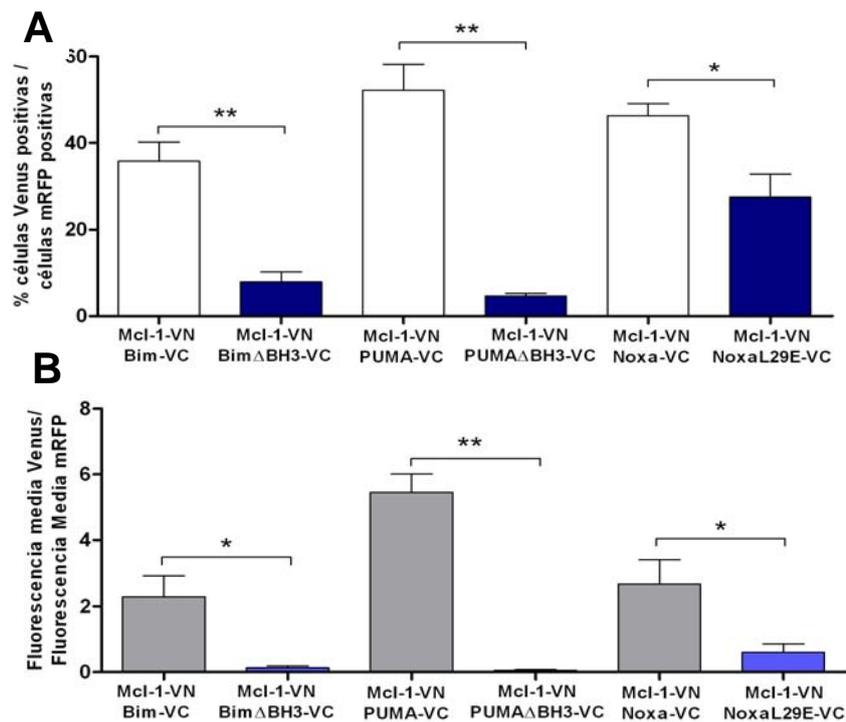
Un dato interesante que se observa en las gráficas de la Figura 4.19 tiene que ver con la proteína denominada PUMA $\Delta$ N. Esta proteína corresponde a la secuencia de aminoácidos común entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de PUMA, de manera que carece de los primeros 92 aminoácidos del extremo amino. La interacción de esta proteína con Mcl-1 es significativamente menor a la observada para la isoforma PUMA  $\alpha$  completa; sin embargo, sorprendentemente, la delección de tres aminoácidos (LRR) del dominio BH3 de PUMA hace aumentar la interacción con Mcl-1, aunque sin alcanzar los valores de fluorescencia vistos para PUMA. La delección de estos aminoácidos se llevó a cabo en la isoforma sin el dominio amino terminal puesto que era ésta la proteína con la que se trabajó inicialmente. Nuestros resultados discrepan con otros trabajos que observan

una importante disminución de la interacción de PUMA $\Delta$ LRR con la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Nakano and Vousden 2001; Yee and Vousden 2008).

Como se explica en la Introducción (Apartado 2.5.2.3) para cada pareja de proteínas cuya interacción se quiere estudiar sería necesario analizar 8 combinaciones de parejas de proteínas de fusión. Para esto se necesitaría generar 4 fusiones distintas para cada proteína: fusión en extremo amino y en carboxilo del fragmento VN y del fragmento VC. En nuestro caso, hemos generado un segundo conjunto de vectores intercambiando los fragmentos de la proteína Venus (Figura 3.3), en todos los casos con el fragmento de Venus fusionado al extremo carboxilo de nuestra proteína.

Para las interacciones de Mcl-1 se llevaron a cabo diferentes transfecciones empleando el vector con la proteína de fusión Mcl-1-VN y las proteínas “sólo-BH3” y sus correspondientes mutantes fusionados al fragmento VC. Se siguió el mismo protocolo que para las otras interacciones en cuanto a tiempos y cantidades de transfección.

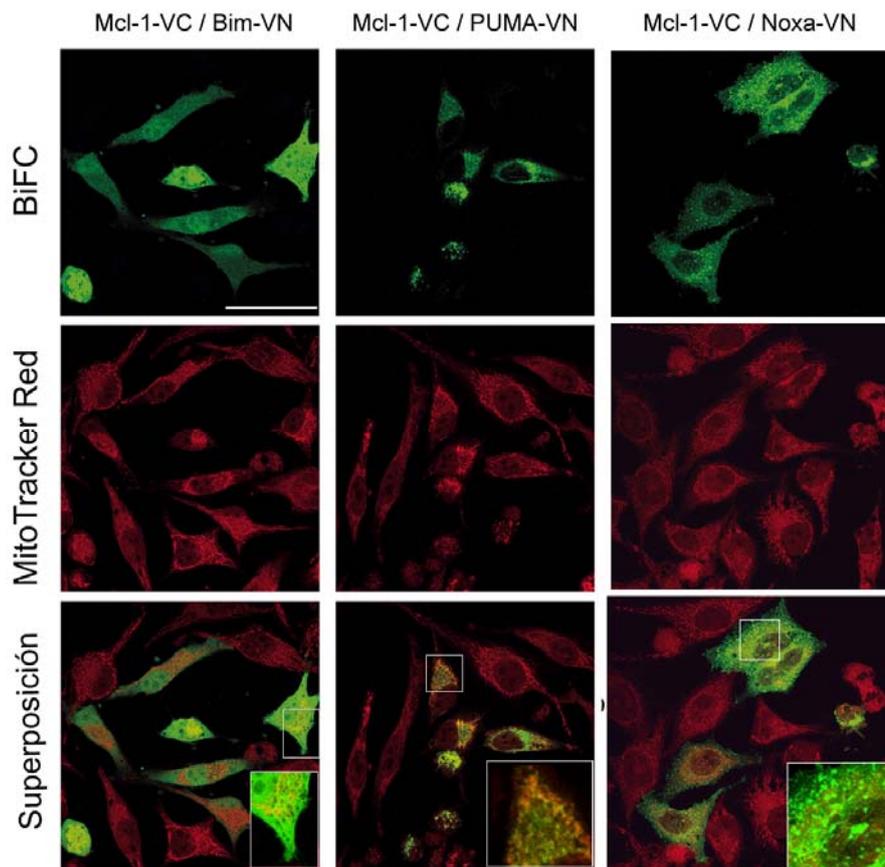
Las gráficas obtenidas a partir de los datos de citometría de flujo (Figura 4.21) indican que las interacciones ocurridas reproducen lo observado con el primer conjunto de proteínas de fusión (Figura 4.19). De nuevo, Mcl-1 es capaz de interactuar con las tres proteínas “sólo-BH3” en un alto porcentaje de las células transfectadas (Figura 4.21 A). Las intensidades de fluorescencia de estos complejos son también elevadas e incluso más altas que con la otra combinación de vectores (Figura 4.21 B). En los tres casos las interacciones se ven significativamente reducidas al deletar el dominio BH3 de Bim y PUMA o al modificar un aminoácido clave de este dominio en la proteína Noxa. Comparando con los datos del otro conjunto de vectores, mostrados en la Figura 4.19, podemos ver un ligero aumento tanto del porcentaje como de la intensidad de fluorescencia de los complejos formados con las proteínas silvestres. Esto sugiere que la complementación de los fragmentos de la proteína Venus es más favorable con esta combinación de vectores.



**Figura 4.21 Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Mcl-1 y las proteínas proapoptóticas Bim, PUMA y Noxa y sus respectivos mutantes de delección o mutación puntual.** Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Por otro lado, como ya se ha indicado anteriormente, la técnica BiFC nos ha permitido analizar la localización de los complejos mediante microscopía confocal. En las fotografías mostradas en la Figura 4.22 se observa que la interacción de Bim con Mcl-1 ocurre en el citosol de células HeLa. Este dato estaría de acuerdo con otros trabajos que describen que Bim es una proteína que se localiza en el citoplasma de algunas células, pudiendo estar asociado a proteínas del citoesqueleto, y en membranas mitocondriales (Puthalakath et al. 1999; Zhu et al. 2004). Por otro lado, los complejos de PUMA con Mcl-1 muestran un patrón punteado que, al compararse con la tinción de mitocondrias con MitoTracker Red en la ampliación mostrada dentro de la fotografía, parece indicar que estas proteínas interactúan en dichos orgánulos. De nuevo, este dato coincide con la localización mitocondrial de PUMA descrita anteriormente por otros autores (Nakano and Vousden 2001; Yee and Vousden 2008). Finalmente, los complejos formados por la interacción entre Mcl-1 y Noxa se localizan en el citosol con un patrón punteado, que colocaliza parcialmente con las

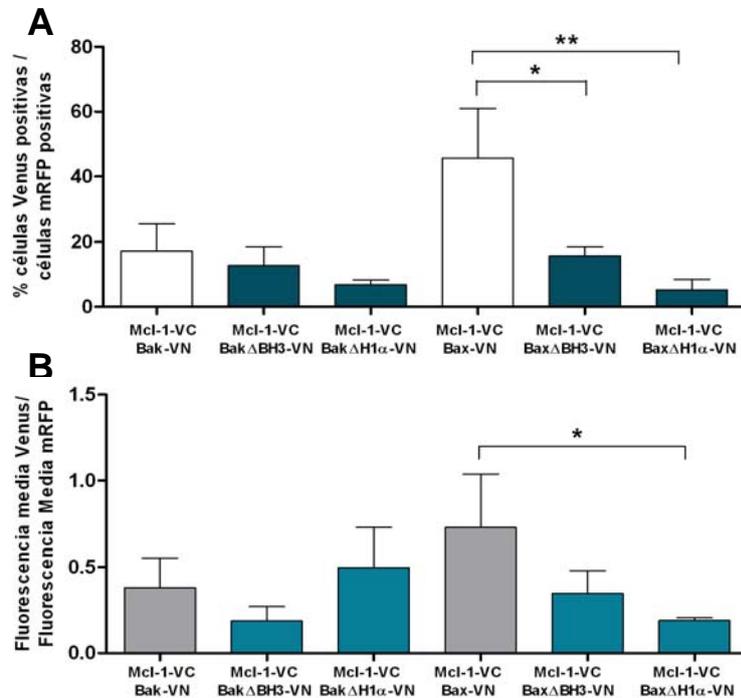
mitocondrias, como se observa en la imagen superpuesta y ampliada, y que coincide con trabajos publicados anteriormente (Oda et al. 2000).



**Figura 4.22 Localización de los complejos Mcl-1/Bim, Mcl-1/PUMA y Mcl-1/Noxa.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Mcl-1 con las diferentes parejas de proteínas indicadas. Escala, 50 $\mu$ m.

A continuación se estudiaron las posibles interacciones entre Mcl-1 y las proteínas multidominio Bak y Bax. Los resultados de nuestros experimentos de BiFC sugieren que Mcl-1 sería capaz de unirse al menos a Bax (Figura 4.23). La unión de Mcl-1 a Bak se ha podido detectar en alrededor de un 20% de las células transfectadas, mientras que los complejos con Bax ocurren en el 50% de las células que se han transfectado (figura 4.23 A). El nivel de fluorescencia emitido por los complejos de Mcl-1 con Bax también es mayor al de Bak (figura 4.23 B). Estos resultados indican que estas interacciones parecen tener menos importancia que las ocurridas entre Mcl-1 y las proteínas “sólo-BH3”, ya que se detectan en un porcentaje menor de células y con una intensidad de fluorescencia también más baja. Probablemente la dificultad de detección de estas interacciones mediante estudios de coimmunoprecipitación se deba

a una baja incidencia de éstas y a que dichas interacciones no sean demasiado fuertes y puedan romperse en el propio proceso de obtención de los extractos celulares.

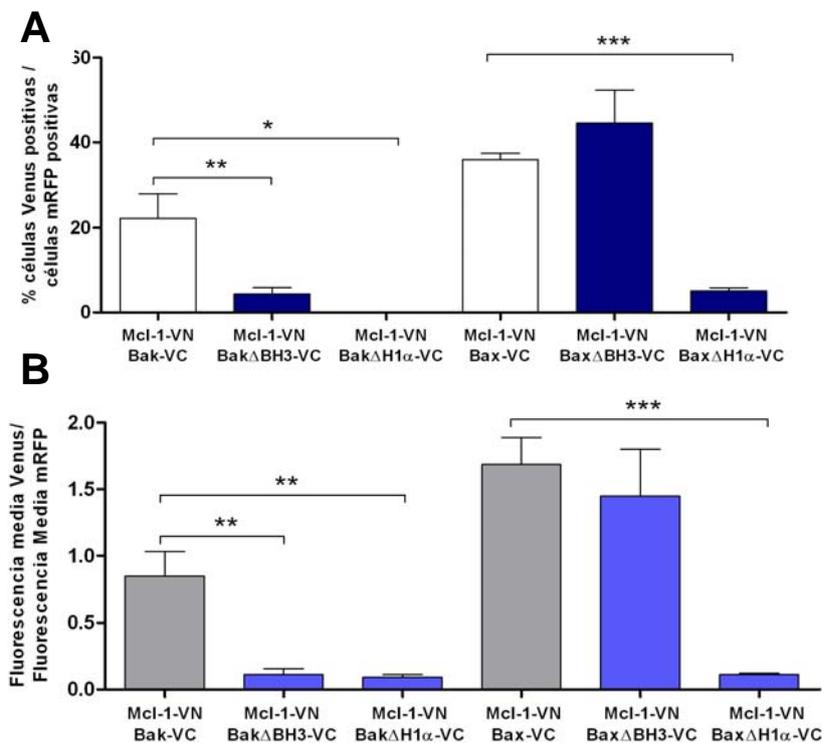


**Figura 4.23 Resultados del análisis de la formación de complejos por BiFC entre Mcl-1 y las proteínas proapoptóticas multidominio Bak y Bax y sus respectivos mutantes de delección mediante citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Cabe destacar que la delección del dominio BH3 de las proteínas proapoptóticas multidominio supone una reducción tanto del porcentaje de complejos formados como de la fluorescencia emitida por éstos. Estos mutantes de delección del dominio BH3 se expresaron correctamente en las células, como se puede observar en la Figura 4.5 y 4.6, cuando se compara con las proteínas silvestres (Figura 4.3). La implicación del dominio BH3 de las proteínas Bak y Bax en su interacción con proteínas antiapoptóticas ha sido descrito por otros autores anteriormente (Kazi et al. 2010; Czabotar et al. 2011; Ku et al. 2011). No obstante, la disminución que se aprecia en la interacción de Mcl-1 con Bak al deleccionar el dominio BH3 de la segunda no es estadísticamente significativa, probablemente debido a la poca relevancia de esta interacción. Otros mutantes que se han estudiado son los que presentan una delección de la primera hélice  $\alpha$  de Bak y Bax ( $\Delta$ H1 $\alpha$ ). Curiosamente, se observa una disminución de las interacciones tanto a nivel de porcentaje de células como de

fluorescencia de los complejos, más evidente en el caso de Bax. Los niveles de expresión de estos mutantes no se ven reducidos (Figura 4.5 y 4.6), por lo que podríamos descartar que la ausencia de interacción fuera consecuencia de una baja expresión en las células. Una posible explicación a la disminución observada con estos mutantes podría ser la existencia de diferentes zonas de interacción con las proteínas antiapoptóticas, tal y como se describe detalladamente en el apartado 4.2.3.

Las interacciones de Mcl-1 con Bak y Bax detectadas con el segundo conjunto vectores muestran unos datos muy similares a los obtenidos con los vectores iniciales (Figura 4.23). Mcl-1 es capaz de interactuar con Bak y Bax (Figura 4.24) aunque de nuevo con unos porcentajes y niveles de fluorescencia más bajos que con Bim, PUMA o Noxa (Figura 2.21). La única diferencia notable respecto al primer conjunto de proteínas de fusión es que en este caso la delección del dominio BH3 de Bak, pero no así el de Bax, reduce significativamente la interacción con Mcl-1, coincidiendo con datos de otros autores (Cuconati et al. 2003; Willis et al. 2005).

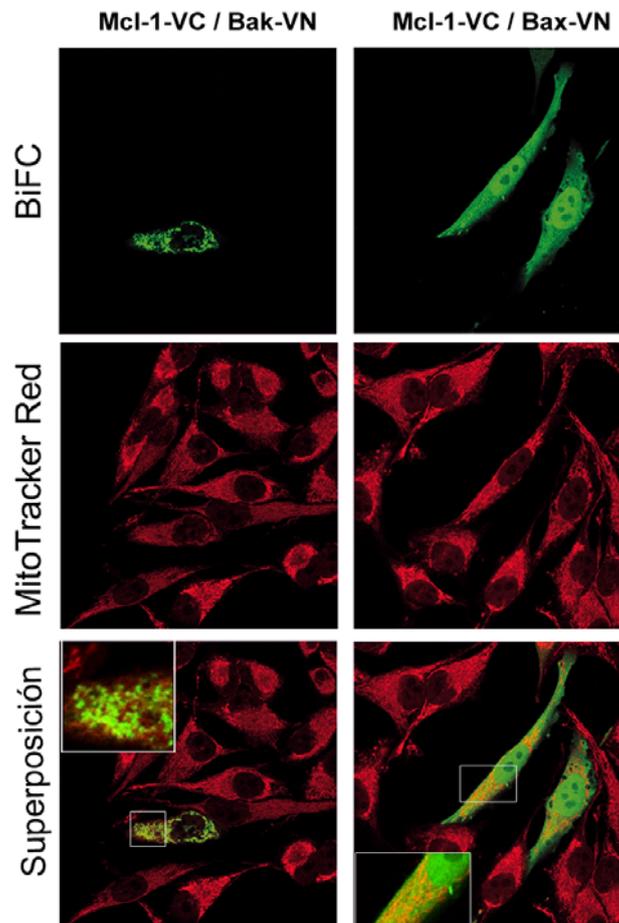


**Figura 4.24** Resultados del análisis de la formación de complejos por BiFC entre Mcl-1 y las proteínas proapoptóticas mutidominio Bak y Bax y sus respectivos mutantes de delección mediante citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Como se observa en las gráficas anteriores la delección de la primera hélice  $\alpha$  tanto de Bak como de Bax hace desaparecer casi en su totalidad la interacción con Mcl-1. Esta disminución observada con el mutante de delección de Bax coincide con el resultado obtenido con el primer grupo de vectores (Figura 4.23), lo cual sugiere que la primera hélice  $\alpha$  de Bax pueda estar directamente implicada en su interacción con proteínas antiapoptóticas.

Nuestros resultados concuerdan con trabajos anteriores en los que observan la interacción de Mcl-1 con Bak mediante ensayos de doble híbrido en levaduras (Bae et al. 2000) y por coimmunoprecipitación (Cuconati et al. 2003; Leu et al. 2004); aunque ésta parece ser dependiente de los detergentes empleados para la preparación de los extractos celulares (Germain et al. 2008). En un trabajo reciente en el que se han utilizado MEF DKO de Bim y Bid se ha observado que solamente un 10% de Mcl-1 coimmunoprecipitaba con Bak (Du et al. 2010), resultado muy similar al nuestro por ensayos de BiFC. En el caso de Bax, no hay trabajos publicados que hayan podido detectar su coimmunoprecipitación con Mcl-1 (Germain et al. 2008) aunque sí existe un trabajo que sugiere esta interacción empleando ensayos de doble híbrido en levaduras (Sedlak et al. 1995). Sin embargo, nuestros resultados muestran una mayor interacción de Mcl-1 con Bax, respecto a Bak, discrepando con los datos de Ku y colaboradores en los que observan, mediante calorimetría de titulación isotérmica, que Bax se une a Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> con una afinidad 30 veces menor que Bak (Ku et al. 2011).

Las fotografías de microscopía confocal de la Figura 4.25 muestran que los complejos de Mcl-1 con Bak tienen una localización mitocondrial, coincidiendo con el marcaje de la sonda MitoTracker Red. Sin embargo, la interacción de Mcl-1 con Bax parece suceder en el citosol de las células, pudiendo haber una colocalización parcial con las mitocondrias de éstas.



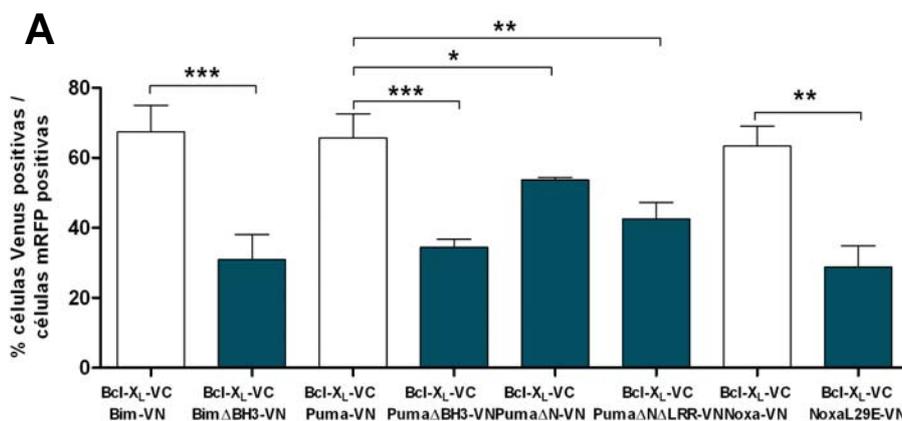
**Figura 4.25 Localización de los complejos Mcl-1/Bak y Mcl-1/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Mcl-1 con las proteínas proapoptóticas Bak y Bax. Escala, 50 $\mu$ m.

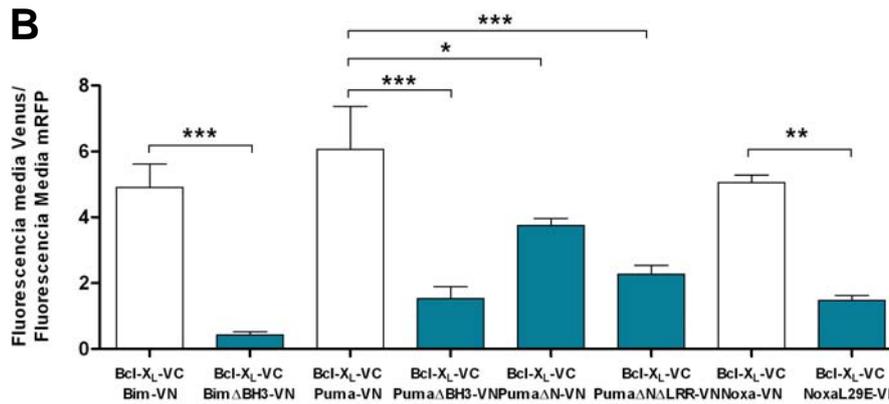
Es probable que, como ocurre en el caso de la interacción de Mcl-1 con Bim (Figura 4.22), los complejos formados por BiFC ente Mcl-1 y Bax tengan una localización citosólica que pudiera no ser la esperada. Como se puede comprobar en las fotografías de las Figuras 4.22 y 4.25, cuando Mcl-1 interacciona con una proteína cuya localización es claramente mitocondrial, como Bak, PUMA o Noxa, los complejos que se forman colocalizan claramente con dichos orgánulos. No obstante, al interaccionar con Bax y Bim que no son proteínas integrales de las mitocondrias, la fluorescencia se distribuye por el citosol de las células e incluso en el núcleo de éstas. Una posible explicación sería que la proteína de fusión Mcl-1-VC no es capaz de anclarse en la membrana mitocondrial y, por lo tanto, los complejos se localizan por toda la célula indistintamente. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la fusión de proteínas en el extremo C-terminal de Mcl-1 no afecta a su localización, que

es parcialmente mitocondrial (Figura 4.10). Además, anteriormente se ha mencionado que existen datos en la literatura que sitúan a Mcl-1 y Bax en el citosol celular (Wolter et al. 1997; Goping et al. 1998; Nijhawan et al. 2003; Xue et al. 2005).

#### 4.2.2. Interacciones de la proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> con proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2.

Al igual que se hizo para Mcl-1 se estudiaron las interacciones que Bcl-X<sub>L</sub> establece en las células con proteínas “sólo-BH3” para analizar su papel neutralizando a dichas proteínas. Para ello las células HeLa se cotransfectaron (apartado 3.3.1) con cantidades equivalentes de dos vectores, uno que codifica Bcl-X<sub>L</sub> fusionada al fragmento carboxilo de la proteína fluorescente Venus (Bcl-X<sub>L</sub>-VC) y otro que contiene el fragmento amino de dicha proteína fluorescente fusionado a Bim (Bim-VN), PUMA (PUMA-VN), Noxa (Noxa-VN) y los correspondientes mutantes. Se analizó la formación de los complejos fluorescentes por citometría de flujo a las 24 horas. Se comprobó que Bcl-X<sub>L</sub> es capaz de interactuar en un porcentaje elevado de células con las tres proteínas “sólo-BH3” (Figura 4.26 A), al igual que lo hacía Mcl-1 (Figura 4.19). Además, los complejos formados tienen una elevada fluorescencia media respecto a la fluorescencia del control interno, mRFP (Figura 4.26 B). En todos los casos la reducción tanto del porcentaje de células fluorescentes como de la intensidad media de los complejos formados es altamente significativa al deletar o modificar el dominio BH3 de las proteínas “sólo-BH3”.





**Figura 4.26** Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas Bim, PUMA y Noxa y sus respectivos mutantes de delección o mutación puntual. Los resultados son media ± SD de siete experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

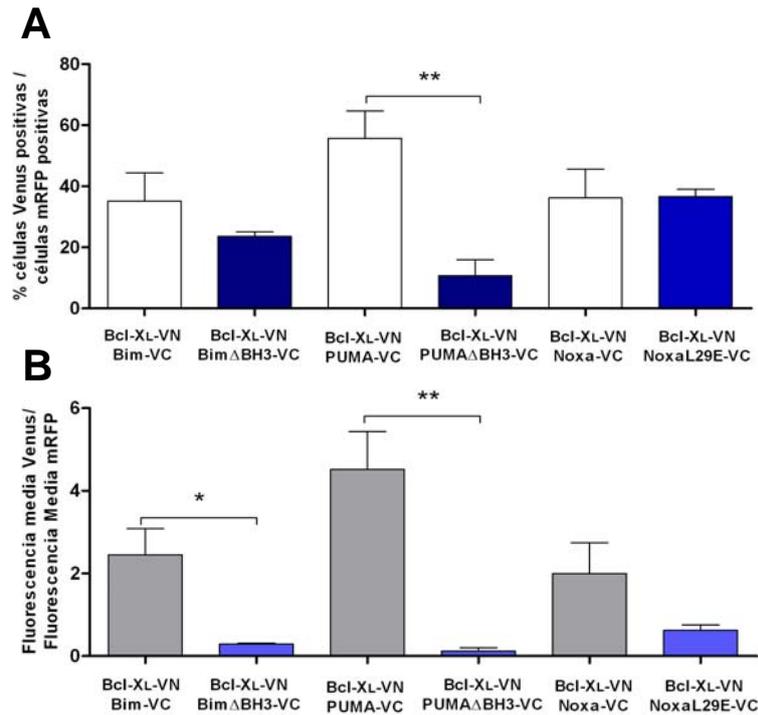
La interacción de Bim con Bcl-X<sub>L</sub> en células vivas ha sido confirmada recientemente en un trabajo de FLIM FRET (Aranovich et al. 2012). Estos autores han observado resultados muy similares a los obtenidos *in vitro* para algunas interacciones de proteínas antiapoptóticas con miembros “sólo-BH3”. No obstante, han confirmado la existencia de interacciones de baja afinidad entre Bim y las proteínas Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2, poniendo de manifiesto la necesidad de estudiar dichas interacciones en un contexto celular.

Como sucede en el caso de Mcl-1 (ver gráficas de la Figura 4.19 para comparar), la proteína PUMAΔN, carente de los primeros 92 aminoácidos del extremo amino, muestra un nivel de interacción estadísticamente menor con Bcl-X<sub>L</sub> que la isoforma α. Estos resultados sugieren, como en el caso de Mcl-1, que el extremo N-terminal de PUMA pueda estar directamente implicado en su unión a proteínas antiapoptóticas, bien directamente, bien por ser necesario para estabilizar a dichas proteínas. Por otra parte, y a diferencia de lo que ocurre con Mcl-1, el mutante de delección generado a partir de esta forma de PUMA ya modificada, PUMAΔNΔLRR, presenta una menor capacidad de interacción con Bcl-X<sub>L</sub>, subrayando así la importancia del dominio BH3 de PUMA para interaccionar con los miembros antiapoptóticos de la familia. Este resultado estaría apoyado por datos de trabajos anteriores (Nakano and Vousden 2001; Yee and Vousden 2008).

La interacción de Noxa con Bcl-X<sub>L</sub> ha sido descartada por otros autores mediante estudios de inmunoprecipitación, habiéndose limitado su afinidad a las proteínas

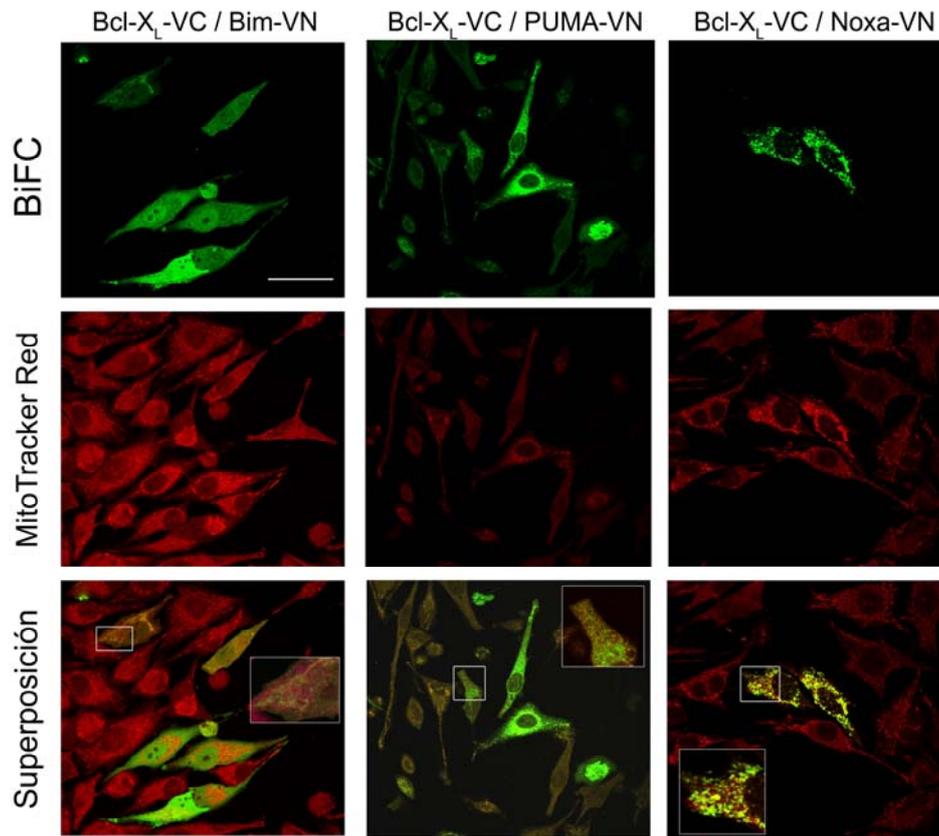
antiapoptóticas Mcl-1 y A1 (Chen et al. 2005; Willis et al. 2005). La razón que dan estos autores para explicar la ausencia de interacción de Noxa con Bcl-X<sub>L</sub> es la presencia de una lisina en la posición del dominio BH3 de Noxa donde normalmente hay un residuo cargado negativamente. Esta lisina es por lo tanto incapaz de establecer una interacción con el correspondiente aminoácido arginina del bolsillo hidrofóbico de Bcl-X<sub>L</sub> (Chen et al. 2005). No obstante, sí se ha descrito la unión de la proteína Noxa de ratón a Bcl-X<sub>L</sub> cuando ambos están sobreexpresados (Oda et al. 2000), situación que se da en nuestros experimentos aunque sea de manera transitoria. También se ha detectado esta interacción en neuronas tratadas con bortezomib (Hagenbuchner et al. 2010) y en células HeLa en respuesta a daño en el DNA (Lopez et al. 2010). Además, un estudio reciente ha descrito que, ante estímulos apoptóticos como estrés del retículo o en presencia de inhibidores del proteasoma, la inducción de Noxa tiene como finalidad secuestrar a Mcl-1 y unirse a Bcl-X<sub>L</sub>, de manera que los dos mayores inhibidores de la apoptosis queden bloqueados (Zhang et al. 2011). La interacción de Noxa con Bcl-X<sub>L</sub> que detectan estos autores mediante inmunoprecipitación parece ser débil *in vitro*, aunque el alto nivel de apoptosis inducido por el aumento de Noxa sugiere que *in vivo* esta interacción tenga una relevancia mayor. Además, en este trabajo utilizan el mismo mutante de Noxa que el empleado en esta tesis, NoxaL29E, el cual no detectan que inmunoprecipite con Bcl-X<sub>L</sub>.

A continuación, se empleó el segundo conjunto de vectores que habíamos generado (Figura 3.3) para analizar las interacciones anteriores. De esta manera, la proteína Bcl-X<sub>L</sub>, que antes se encontraba unida al fragmento carboxilo de Venus (VC), pasaba a estar fusionada al fragmento amino (VN). Por lo tanto, las parejas con las que se estudió su interacción, quedaban unidas al fragmento VC. Los resultados de citometría de flujo mostraron resultados muy similares a los obtenidos con el primer conjunto de vectores para las interacciones con las proteínas “sólo-BH3” (Figura 4.27), aunque el porcentaje de células y la intensidad de fluorescencia que éstas presentan son menores en general. Estos datos podrían indicar una mayor dificultad de complementación de estos vectores, respecto a los otros vectores empleados. La proteína antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> es capaz de unirse a las tres proteínas “sólo-BH3” estudiadas, dando un porcentaje de interacción (A) y una relación de intensidades medias de fluorescencia (B) elevados. Se pudo apreciar, además, un importante bloqueo de estas interacciones al delecionar o modificar el dominio BH3 de las proteínas “sólo-BH3”, aunque no fue estadísticamente significativo en los porcentajes de interacción con Bim $\Delta$ BH3 y NoxaL29E.



**Figura 4.27** Resultados del análisis de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y sus respectivos mutantes mediante citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

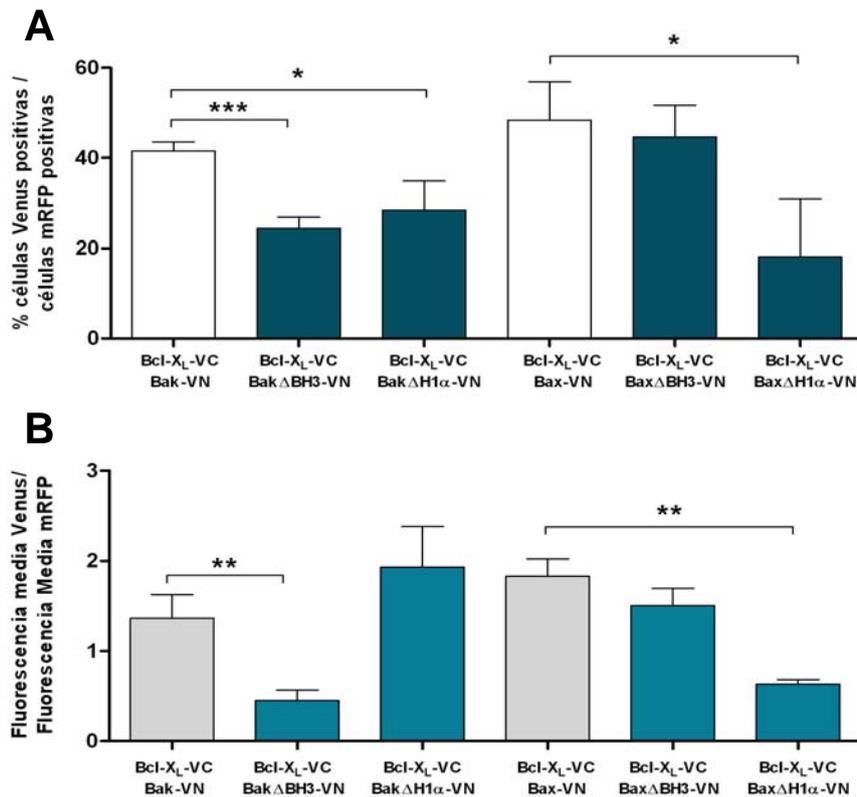
La visualización por microscopía confocal de los complejos formados por BiFC (Figura 4.28) permitió observar que las parejas Bcl-X<sub>L</sub>/PUMA y Bcl-X<sub>L</sub>/Noxa muestran un patrón de fluorescencia punteado en las células, coincidiendo con la localización mitocondrial descrita anteriormente para estas proteínas (Oda et al. 2000; Yu et al. 2001). Como se ha explicado anteriormente para Mcl-1, los complejos que forma Bcl-X<sub>L</sub> con Bim se localizan esencialmente en el citosol de las células, dando una fluorescencia difusa que se detecta incluso en el núcleo de éstas. En algunas células, como muestra la sección ampliada de la fotografía, la fluorescencia detectada es de menor intensidad, lo cual permitiría apreciar una colocalización parcial con las mitocondrias, al comparar con el marcaje con la sonda MitoTracker Red.



**Figura 4.28 Localización de los complejos Bcl-X<sub>L</sub>/Bim, Bcl-X<sub>L</sub>/PUMA y Bcl-X<sub>L</sub>/Noxa.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa. Escala, 50µm.

Al igual que Mcl-1, también se ha propuesto que Bcl-X<sub>L</sub> pueda estar implicada en el bloqueo de las proteínas multidominio Bak y Bax evitando su activación y oligomerización (Farrow et al. 1995; Willis et al. 2007). Por lo tanto, quisimos comprobar si esta proteína antiapoptótica era capaz de unirse a los efectores Bak y Bax. Como podemos observar en la gráfica de la Figura 4.29 A, Bcl-X<sub>L</sub> puede establecer interacciones con ambas proteínas multidominio en un porcentaje de células similar a Mcl-1 en el caso de Bax y mayor en el de Bak (Figura 4.23). Los complejos que se forman por complementación de fluorescencia presentan una intensidad de fluorescencia baja (Figura 4.29 B) si se compara con las interacciones de Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas “sólo-BH3” (Figura 4.26 B). A pesar de esto, se puede observar una disminución del porcentaje de células fluorescentes y de la intensidad de fluorescencia cuando se deleta el dominio BH3 de Bak, coincidiendo con la implicación de éste señalada por otros autores (Zha et al. 1996; Sattler et al. 1997;

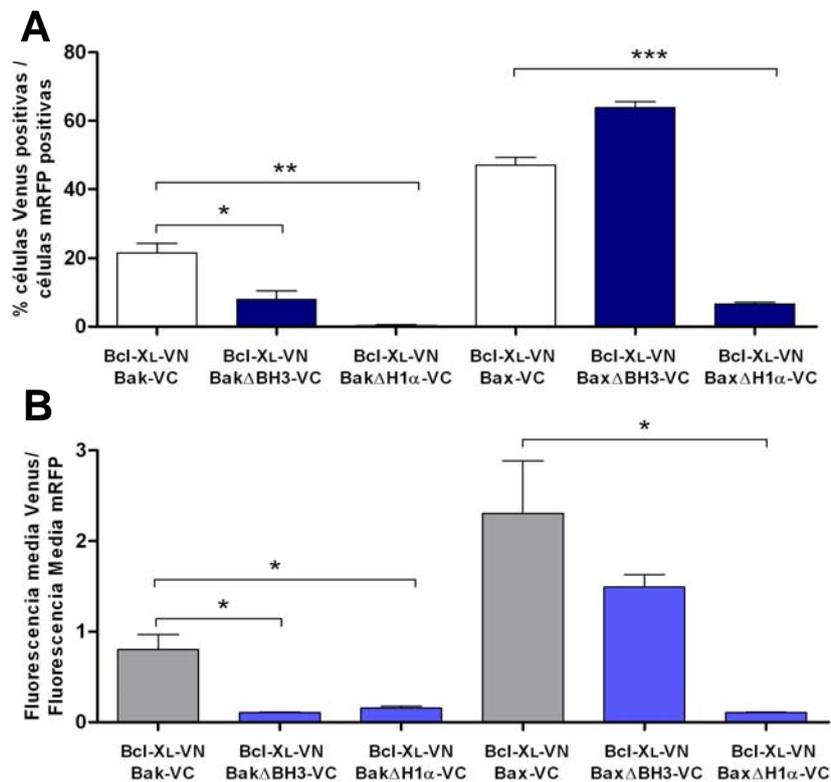
Petros et al. 2004). Se ha observado el papel clave de la leucina 78 del dominio BH3 de Bak, que al ser sustituida por una alanina sufre una disminución de la afinidad por Bcl-X<sub>L</sub> de 800 veces (Petros et al. 2004). En cuanto a Bax, solamente se observa una disminución de fluorescencia significativa cuando se deletiona su primera hélice  $\alpha$ , sugiriendo su participación en la interacción con Bcl-X<sub>L</sub>, independientemente de su dominio BH3.



**Figura 4.29 Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax y sus respectivos mutantes de delección.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Cuando se analizaron las interacciones de Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas Bak y Bax con el segundo conjunto de proteínas de fusión (Figura 4.30), se obtuvieron unos resultados muy similares a los anteriores (Figura 4.29) y a los de Mcl-1 para este mismo conjunto de vectores (Figura 4.24). Bcl-X<sub>L</sub> interactúa en mayor porcentaje de células con Bax y formando unos complejos que emiten una fluorescencia también mayor, respecto a Bak. La delección de la primera hélice de ambas proteínas rompe las interacciones en su totalidad y destaca el hecho de que el mutante de delección del

dominio BH3 de Bax sigue manteniendo la capacidad de interactuar, incluso en un porcentaje mayor de células, con la proteína antiapoptótica. Curiosamente, este dato se obtuvo también para la interacción del mismo mutante con Mcl-1 empleando la segunda combinación de vectores (Figura 4.24). Estos datos apoyarían de nuevo la existencia de una zona independiente del dominio BH3 de Bax por la que ésta interactuaría con los miembros antiapoptóticos de la familia (Ding et al. 2010).

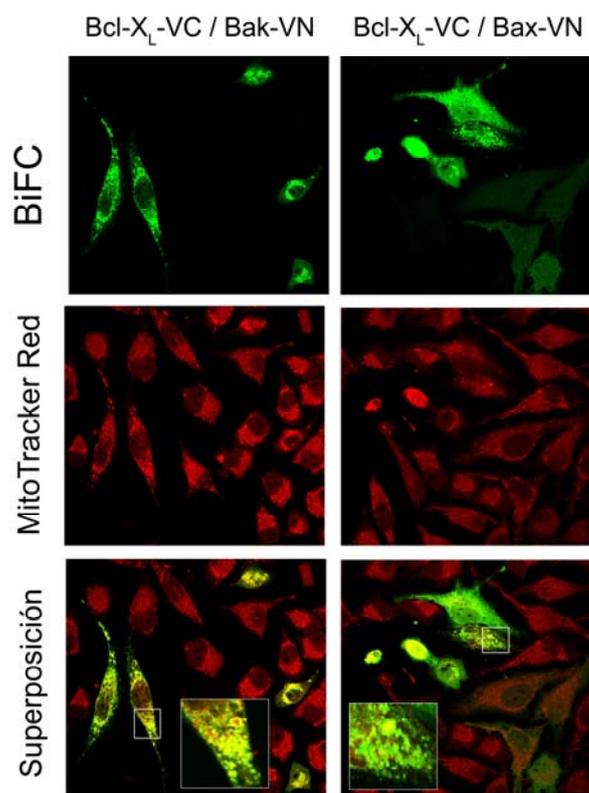


**Figura 4.30 Resultados del análisis de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax y sus respectivos mutantes mediante citometría de flujo.** Los resultados son media ± SD de tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

Hay un modelo en la literatura que describe que en condiciones normales Bcl-X<sub>L</sub> está asociado a otras moléculas de Bcl-X<sub>L</sub> y también formando heterodímeros con proteínas efectoras, Bak y Bax (Bhat et al. 2012). Cuando se recibe un estímulo apoptótico se inducen proteínas como Bim o Bad que van a competir con la homodimerización de Bcl-X<sub>L</sub>, haciendo que las proteínas efectoras queden libres para insertarse en la membrana mitocondrial externa (MME). Además, el desplazamiento del dominio transmembrana de Bcl-X<sub>L</sub> de su bolsillo hidrofóbico por la unión competitiva de proteínas “sólo-BH3” va a activar la translocación e inserción de Bcl-X<sub>L</sub> a la MME (Bhat et al. 2012). Esta transición solución-membrana causa una alteración

en el bolsillo hidrofóbico de Bcl-X<sub>L</sub> de manera que los ligandos BH3 se soltarán de ella, de acuerdo con el modelo de interacciones “hit and run” (Bhat et al. 2012).

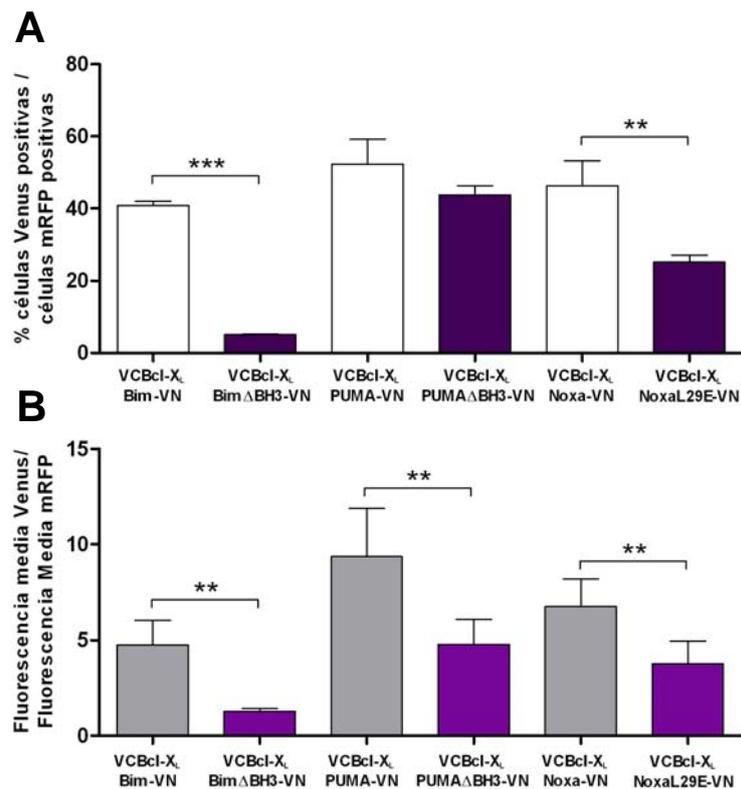
En las fotografías de microscopía confocal los complejos de Bcl-X<sub>L</sub> con Bak muestran una distribución punteada que coincide claramente con el marcaje de la sonda mitocondrial MitoTracker Red en la imagen superpuesta (Figura 4.31). Esto concuerda con la localización mitocondrial de Bak anteriormente descrita por Griffiths y colaboradores (Griffiths et al. 1999). Por su parte, y como ocurría con Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> parece interactuar con Bax en el citosol de algunas células mientras que en otras los complejos muestran una distribución parcialmente mitocondrial. Este resultado estaría de acuerdo en cierta medida con el trabajo que describe que Bcl-X<sub>L</sub> interactúa con Bax para impedir su activación y su unión a otros activadores como tBid en membranas (Billen et al. 2008a). También estaría en concordancia con otros autores que muestran la capacidad de Bcl-X<sub>L</sub> de retrotranslocar a Bax de las mitocondrias al citosol de las células (Edlich et al. 2011).



**Figura 4.31 Localización de los complejos Bcl-X<sub>L</sub>/Bak y Bcl-X<sub>L</sub>/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas proapoptóticas multidominio Bak y Bax. Escala, 50µm.

Como se explica en el apartado 4.1.3.2, algunos autores han descrito que Bcl-X<sub>L</sub> se localiza en condiciones normales en el citosol de células sanas (Hsu et al. 1997; Cuttle et al. 2001) formando homodímeros (Jeong et al. 2004; O'Neill et al. 2006). Asimismo, se ha descrito que esta proteína se ancla a las membranas de las mitocondrias principalmente a través de su dominio C-terminal hidrofóbico (Kaufmann et al. 2003), aunque posee otras secuencias con capacidad de formar poros en membranas (Schendel et al. 1998; Garcia-Saez et al. 2004). Por esta razón, y habiendo comprobado que la localización de Bcl-X<sub>L</sub> variaba mucho en función del extremo al que se fusionaba la proteína fluorescente EYFP (Figura 4.13), decidimos generar un nuevo constructo en el que el fragmento de la proteína Venus estuviera en el extremo amino de Bcl-X<sub>L</sub>, pBiFC-VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Para esto, llevamos a cabo la amplificación por PCR de los tres segmentos de DNA individuales: fragmento carboxilo de Venus (VC), linker o espaciador y secuencia de Bcl-X<sub>L</sub>. Se mantuvo la misma secuencia espaciadora entre las dos proteínas que presentaban los vectores pBiFC inicialmente, y se tuvo en consideración la eliminación del codón stop del fragmento VC así como la introducción del mismo en Bcl-X<sub>L</sub>. Un esquema más detallado del procedimiento seguido se puede ver en la Figura 3.6 (página 92). El protocolo de transfección y el análisis de los complejos formados por citometría de flujo y microscopía confocal fue el mismo que para los vectores anteriores.

Las gráficas de la siguiente figura muestran que la proteína VC-Bcl-XL es capaz de interactuar con las tres proteínas “sólo-BH3” (Figura 4.32). Estos resultados coinciden con los obtenidos cuando se transfectaron las células con los dos conjuntos de vectores con el fragmento VC en el extremo carboxilo de Bcl-X<sub>L</sub> (ver gráficas de Figuras 4.26 y 4.27 para comparar). Además, los porcentajes de células que presentan fluorescencia son muy similares independientemente de la combinación de vectores empleados (Figura 4.32 A). La fluorescencia media de los complejos formados sigue también la misma tendencia, siendo ésta mayor para la interacción con PUMA que para Bim o Noxa y disminuyendo significativamente al modificar o deletar el dominio BH3 de las proteínas “sólo-BH3” (Figura 4.32 B).

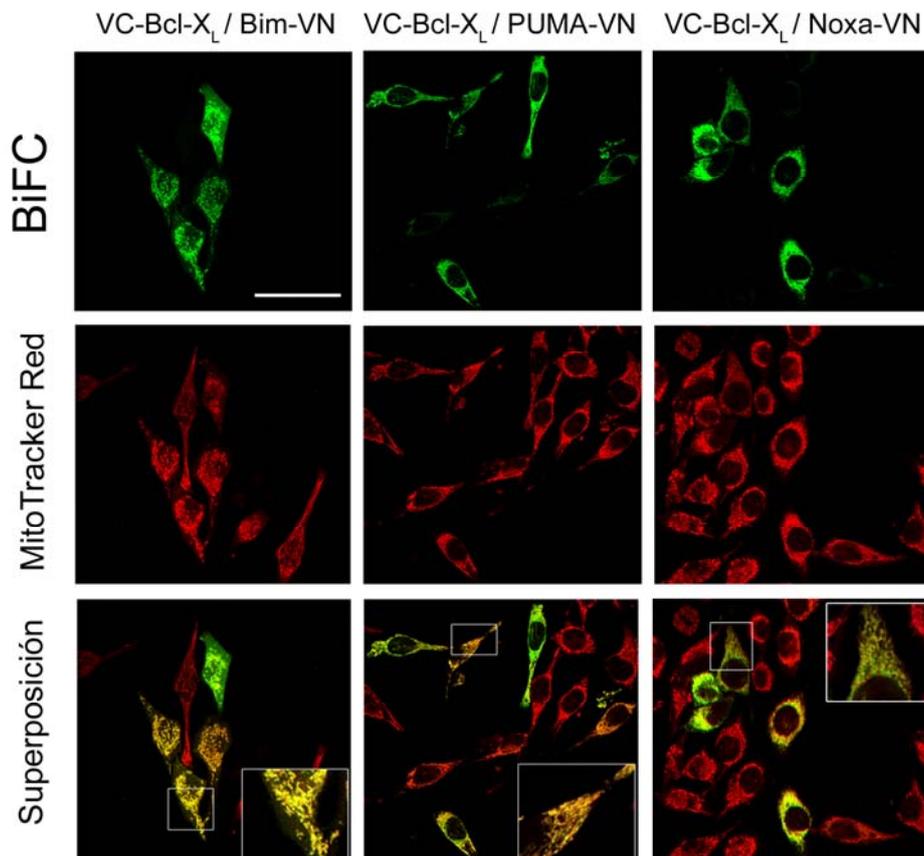


**Figura 4.32** Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y sus respectivos mutantes empleando el vector con la proteína de fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Estos resultados permiten afirmar que, a pesar de que la localización de la proteína Bcl-X<sub>L</sub> pudiera verse alterada por la presencia de otra proteína en su extremo carboxilo, las interacciones que hemos detectado empleando la proteína de fusión Bcl-X<sub>L</sub>-VC son específicas y no producto de una expresión errónea de ésta. Sin embargo, cabe destacar que en las interacciones con PUMA y Noxa se observa unas intensidades de fluorescencia mayores que empleando los otros vectores con el fragmento VC en el extremo carboxilo de Bcl-X<sub>L</sub> (comparar con Figuras 4.26 y 4.27). Esto podría indicar que la nueva proteína de fusión generada favorece la complementación de los dos fragmentos de la proteína Venus.

A continuación, analizamos la localización de los complejos anteriores por microscopía confocal. Las fotografías y más concretamente las ampliaciones realizadas en la superposición de la fluorescencia verde de los complejos de BiFC y

roja de la sonda mitocondrial MitoTracker Red, ponen en evidencia que las interacciones entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas “sólo-BH3” estudiadas ocurren mayoritariamente en las mitocondrias de las células (Figura 4.33). Es especialmente llamativo el caso de la interacción con Bim, que pasa de tener una localización completamente citosólica en los complejos con Bcl-X<sub>L</sub>-VC (Figura 4.28) a ser esencialmente mitocondrial con VC-Bcl-X<sub>L</sub>, a pesar de no verse variaciones importantes en los porcentajes ni en las intensidades de fluorescencia.

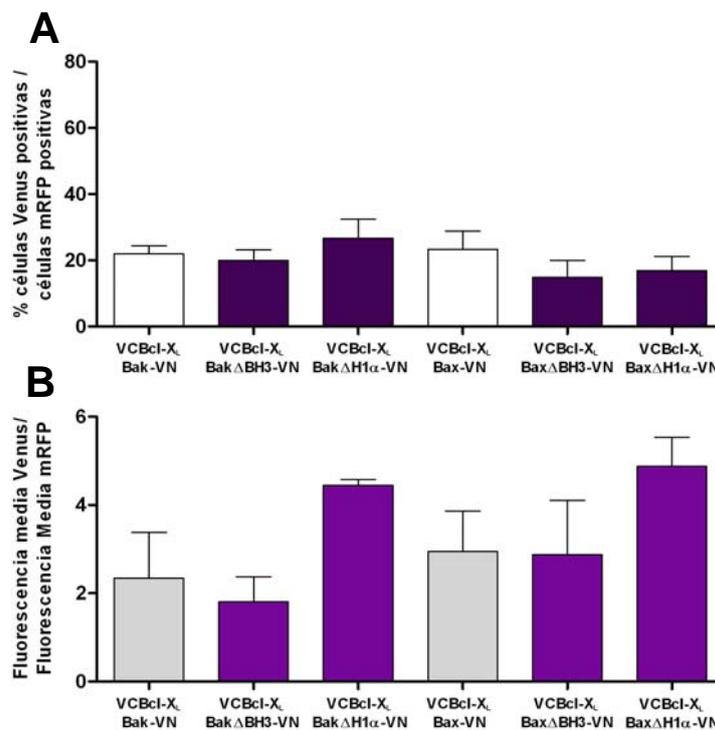


**Figura 4.33 Localización de los complejos VC-Bcl-X<sub>L</sub>/Bim, VC-Bcl-X<sub>L</sub>/PUMA y VC-Bcl-X<sub>L</sub>/Noxa.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa empleando la proteína de fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Escala, 50µm.

No obstante, en algunas células los complejos de Bim con VC-Bcl-X<sub>L</sub> parecen seguir localizándose en el citosol, aunque mostrando una fluorescencia mucho menos intensa. Una posible explicación sería que, dado que ambas proteínas se pueden localizar en el citosol (Hsu et al. 1997; Puthalakath et al. 1999; Cuttle et al. 2001), éstas puedan interactuar allí pero que mayoritariamente los complejos se formen en las mitocondrias, en las que Bcl-X<sub>L</sub>, ahora con su dominio carboxilo libre, puede

insertarse. La estructura del complejo que forma Bcl-X<sub>L</sub> con la hélice que contiene el dominio BH3 correspondiente a Bim ha sido descrita anteriormente (Liu et al. 2003). Según este trabajo, además de las interacciones previstas entre los residuos hidrofóbicos conservados del dominio BH3 de Bim con los del bosillo hidrofóbico de Bcl-X<sub>L</sub>, la región transmembrana de Bim, localizada a continuación de la hélice BH3, puede establecer interacciones con la hélice  $\alpha$  8 de Bcl-X<sub>L</sub> (Liu et al. 2003). De esta manera, el complejo tiene una orientación adecuada para interactuar cuando ambas proteínas están asociadas a membranas.

Cuando estudiamos las interacciones de VC-Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas multidominio efectoras Bax y Bak observamos que éstas ocurren en un porcentaje menor de células (Figura 4.34 A) en comparación a las proteínas “sólo-BH3”. Más acusada todavía es la diferencia en las intensidades de fluorescencia de los complejos (Figura 4.34 B), lo cual nos estaría indicando que estas interacciones son mucho menos frecuentes en la célula. Además, podemos ver que las interacciones con las proteínas silvestres no varían excesivamente en porcentaje ni intensidad de fluorescencia de los complejos, independientemente de la combinación de proteínas de fusión utilizada.

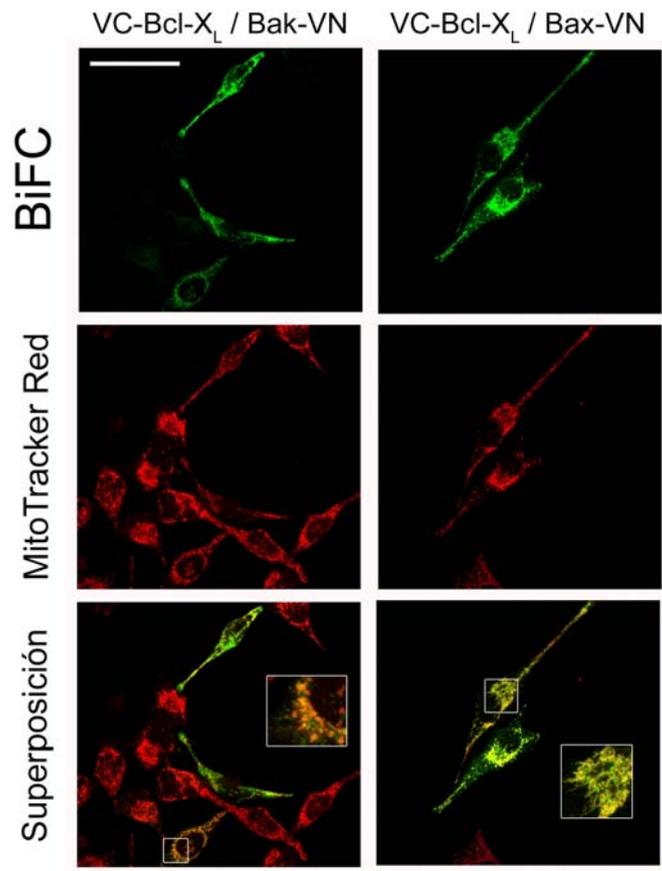


**Figura 4.34 Análisis mediante citometría de flujo de la formación de complejos por BiFC entre Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas proapoptóticas multidominio Bak y Bax y sus respectivos mutantes empleando el vector con la proteína de fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.**

Cabe destacar que al emplear la nueva proteína VC-Bcl-X<sub>L</sub> se observa un aumento de la fluorescencia de los complejos formados con los mutantes de delección de la primera hélice de Bak y de Bax. Este resultado estaría en desacuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 4.29 y 4.30 en los que dichos mutantes rompían las interacciones con Bcl-X<sub>L</sub>. Sin embargo, los porcentajes de células en los que se observan los complejos fluorescentes son muy bajos para todas las parejas de proteínas estudiadas. Esto podría estar indicando que la señal que se observa en estos casos es debida a una asociación espontánea y no específica de los fragmentos.

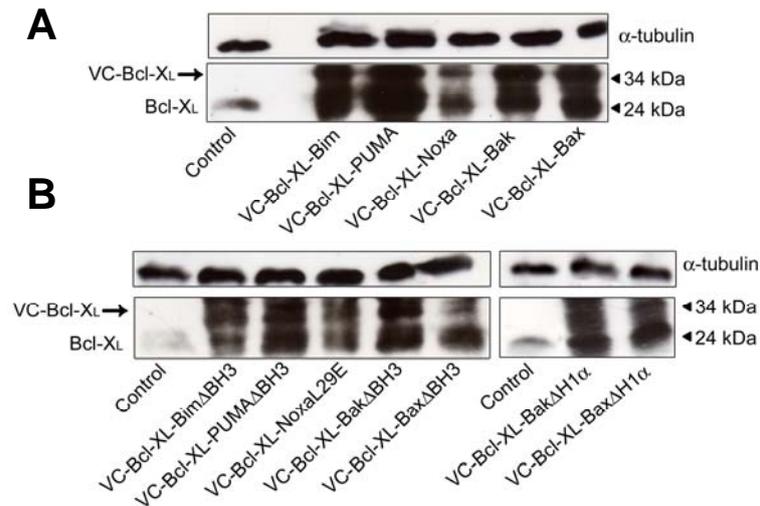
Al haber comprobado las interacciones de Bcl-X<sub>L</sub> con Bak y Bax empleando tres combinaciones diferentes de proteínas de fusión, podríamos descartar que estén ocurriendo impedimentos estéricos que eviten la formación de estos complejos y que por ello no los estemos detectando mediante esta técnica. No obstante, sería recomendable analizar la interacción de la proteína VC-Bcl-X<sub>L</sub> con VN-Bak y VN-Bax. De esta manera se podría descartar que los fragmentos de la proteína Venus no estén demasiado alejados como para complementarse al emplear las combinaciones presentadas en la Figura 4.34.

El análisis de las fotografías de microscopía confocal permite afirmar que los complejos de VC-Bcl-X<sub>L</sub> con Bak tienen localización mitocondrial, observada claramente en la superposición de la fluorescencia verde correspondiente a la señal de BiFC y la roja de la sonda MitoTracker Red (Figura 4.35). En los complejos formados con Bax (Figura 4.35) ocurre lo mismo que con Bim (Figura 4.33), ya que se observa un cambio drástico en la localización de los complejos en función de dónde se realice la fusión en Bcl-X<sub>L</sub>. Así, cuando la proteína de fusión de Bcl-X<sub>L</sub> tiene libre su extremo carboxilo, ésta puede insertarse en las membranas mitocondriales y parece que arrastra hacia estos orgánulos a Bax.



**Figura 4.35 Localización de los complejos VC-Bcl-X<sub>L</sub>/Bak y VC-Bcl-X<sub>L</sub>/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por Bcl-X<sub>L</sub> con las proteínas Bak y Bax empleando la proteína de fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub>. Escala, 50µm.

El nivel de expresión de la nueva proteína de fusión, VC-Bcl-X<sub>L</sub>, se analizó por western-blot para las distintas combinaciones de vectores transfectados. Se puede observar que esta proteína de fusión se expresa correctamente cuando se transfecta con las proteínas silvestres así como con los correspondientes mutantes (Figura 4.36).



**Figura 4.36 Análisis por western-blot de la proteína de fusión VC-Bcl-X<sub>L</sub> en combinación con las distintas parejas de transfección silvestres (A) y mutantes (B).** El peso molecular de la proteína de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VC ~ 10,5 KDa).

#### 4.2.3. Discusión sobre el papel de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> en la vía intrínseca de la apoptosis.

Se ha estudiado mediante la técnica de complementación de fluorescencia, BiFC, las interacciones que se establecen entre las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> y los dos subgrupos de proteínas proapoptóticas, las “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y las multidominio Bax y Bak. Además, diferentes mutantes de delección así como de sustitución puntual se han empleado para verificar las interacciones detectadas y evaluar el papel que zonas concretas de estas proteínas pueden jugar en dichas interacciones.

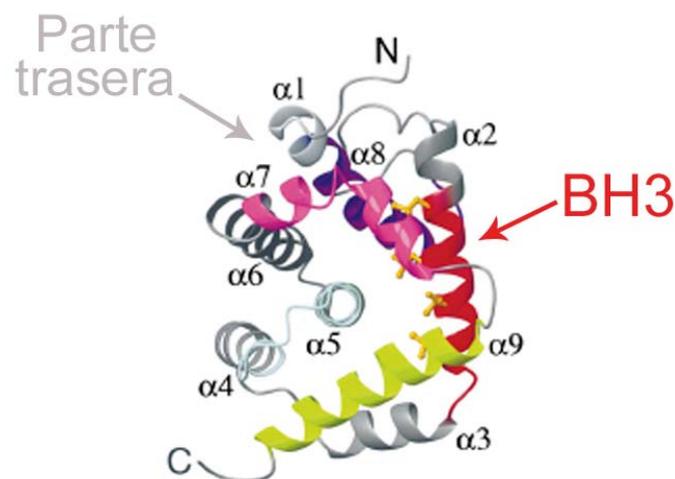
El papel de las proteínas antiapoptóticas ha sido muy discutido en la literatura empleando diferentes técnicas para evaluar su unión a los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Por una parte, algunos estudios de coimmunoprecipitación y estructurales utilizando péptidos sintéticos han descrito la unión de las proteínas antiapoptóticas a Bak y Bax (Cuconati et al. 2003; Leu et al. 2004; Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Estos trabajos defienden la existencia de un modelo indirecto de activación de Bax y Bak, de manera que Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> tendrían como papel fundamental unirse a estas proteínas efectoras y neutralizarlas para evitar su activación y consiguiente permeabilización de las membranas mitocondriales. De esta

manera, cuando hubiera una inducción de las proteínas “sólo-BH3” por diferentes estímulos apoptóticos, éstas se unirían con gran afinidad a Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas efectoras liberadas podrían provocar la permeabilización de las mitocondrias. Otros autores han defendido que Bak y Bax se activen por unión directa de algunas proteínas “sólo-BH3” concretas, entre las que se ha propuesto a Bid (Lovell et al. 2008), Bim (Czabotar et al. 2009), PUMA (Kim et al. 2009) y Noxa (Du et al. 2010), que en condiciones normales se encuentran unidas a proteínas antiapoptóticas. Tras la recepción de un estímulo apoptótico, las proteínas “sólo-BH3” sensibilizadoras inducidas desplazarían a las anteriores al unirse a las antiapoptóticas y las activadoras quedarían libres para activar a las moléculas efectoras Bax y Bak.

Según nuestros resultados las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> son capaces de unirse tanto a las proteínas “sólo-BH3” como a las proapoptóticas multidominio Bak y Bax, aunque lo hacen de manera preferente a las primeras. Estos datos estarían de acuerdo con los modelos que se están proponiendo más recientemente y que tienen como base la unificación de los dos anteriores (Leber et al. 2007; Leber et al. 2010; Llambi et al. 2011). De esta manera, proteínas como Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1 tendrían la función de unirse y neutralizar a moléculas de proteínas “sólo-BH3” activadoras cuando se induce la apoptosis. En condiciones de estrés elevado se produce una inducción de los activadores directos que supera la capacidad de neutralización de los miembros antiapoptóticos. Esto aumenta la fracción de activadores libres y capaces de activar a los efectores Bak y Bax. En estas condiciones, los efectores serían secuestrados por las proteínas antiapoptóticas, previniendo así su activación y consiguiente permeabilización mitocondrial. Estos datos son compatibles con la existencia de una compleja red de interacciones entre las proteínas de esta familia, que sería compatible con aspectos de ambos modelos de activación. Además, parece lógico pensar que dentro de cada modelo celular o en respuesta a diferentes estímulos, las interacciones que ocurran sean distintas según las proteínas que sean inducidas y el balance entre proteínas pro y antiapoptóticas que se alcance.

La implicación del dominio BH3 de las proteínas Bak y Bax en su interacción con los miembros antiapoptóticos de la familia ha sido descrita anteriormente (Kazi et al. 2010; Czabotar et al. 2011; Ku et al. 2011). No obstante, algunos autores han sugerido que exista una zona de unión entre Bcl-2 y Bax distinta del bolsillo hidrofóbico de la primera y el dominio BH3 de la segunda. Ding y colaboradores han determinado que estas proteínas pueden interaccionar por su parte trasera (Ding et al. 2010),

coincidiendo con la zona en la que se ha determinado que se unan los ligandos activadores “sólo-BH3” a Bax (Cartron et al. 2004a; Gavathiotis et al. 2008; Kim et al. 2009) (ver representación de la estructura de Bax en la Figura 4.37). Por ello, se plantea que Bcl-2 se una mediante su dominio BH4 a Bax en esta zona, cuando las proteínas “sólo-BH3” se hayan disociado de ella, previniendo así la oligomerización de Bax en las membranas. Curiosamente, se ha descrito que Bcl-X<sub>L</sub> compite con Bax por su unión y activación de más monómeros de Bax citosólico, inhibiendo así la unión de Bax a las membranas (Billen et al. 2008a). Es posible que Bcl-X<sub>L</sub> tenga la misma capacidad que Bcl-2 para unirse a Bax en esa zona trasera formada por las hélices 1 y 6 y por ello nosotros observemos una disminución parcial de la interacción entre estas proteínas cuando deletamos la hélice 1 de Bax (Figura 4.29 A y B). Estos mismos resultados se habían obtenido para Mcl-1 (Figuras 4.23 y 4.24) por lo que es posible que Mcl-1, a pesar de carecer de esta región BH4, esté interaccionando con la parte trasera de los monómeros de Bax a través de la zona opuesta a su bolsillo hidrofóbico.



**Figura 4.37 Representación de la estructura de Bax.** Los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 se han representado en cian, rosa, rojo y lila respectivamente. La hélice C-terminal se muestra en verde. Las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos Leu60, Leu63, Ile66 y Leu70 del dominio BH3 se han representado en amarillo. Se ha modificado la figura de (Suzuki et al. 2000) para señalar el dominio BH3 y la parte trasera ( $\alpha 1$  y  $\alpha 6$ ) de la molécula de Bax.

Por ello, tal y como indican Lee y colaboradores, sería muy interesante obtener las estructuras de proteínas antiapoptóticas en complejo con Bak y Bax para poder confirmar la existencia de esta zona alternativa al dominio BH3 donde se pueden dar interacciones importantes (Lee and Fairlie 2012). Esta posibilidad ya había sido sugerida anteriormente en otros trabajos. Polcic y colaboradores demostraron que

proteínas como Bcl-X<sub>L</sub> actuaban a dos niveles sobre Bax (Polcic and Forte 2003). La interacción entre las formas solubles citosólicas inhibía el direccionamiento de Bax hacia la mitocondria. Sin embargo, la interacción entre las formas integradas en membranas bloqueaba la activación de Bax. Estos autores sugieren que diferentes dominios de interacción, no solamente el BH3, pueden estar implicados en estos dos tipos de inhibición (Polcic and Forte 2003).

#### **4.3 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS “SÓLO-BH3” BIM, PUMA Y NOXA COMO ACTIVADORAS DIRECTAS DE LAS PROTEÍNAS EFECTORAS BAX Y BAK.**

Se ha especulado mucho sobre el papel de las proteínas “sólo-BH3” en la vía intrínseca de la apoptosis desde el descubrimiento de esta gran familia de proteínas hace ya más de 20 años. Como hemos visto en los experimentos mostrados en el apartado 4.2, las tres proteínas “sólo-BH3” analizadas, Bim, PUMA y Noxa, son capaces de unirse con gran afinidad a proteínas antiapoptóticas como Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1, y en estas interacciones juega papel clave el dominio BH3 de las primeras. La unión de las proteínas “sólo-BH3” a los miembros antiapoptóticos de la familia sería uno de los mecanismos por los que podría ocurrir la activación de Bak y Bax, suponiendo que éstas estuvieran unidas a dichas proteínas antiapoptóticas antes de recibirse el estímulo que indujera la vía mitocondrial de la apoptosis (modelo indirecto).

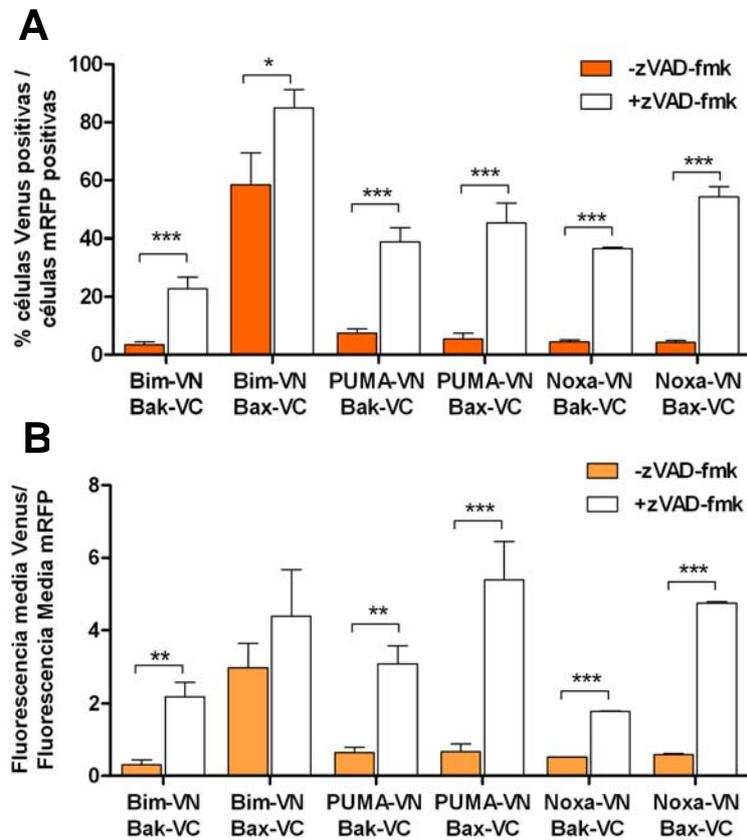
Otro mecanismo alternativo que se ha propuesto se basa en la activación de Bak y Bax por unión directa de algunas proteínas “sólo-BH3”. La proteína tBid fue la primera en ser propuesta como activadora tanto de Bak como Bax (Desagher et al. 1999; Wei et al. 2000; Lovell et al. 2008; Terrones et al. 2008); pero también se ha observado que otras como Bim, PUMA o Noxa puedan tener un papel activador, más allá de la simple inhibición de proteínas antiapoptóticas (Letai et al. 2002; Marani et al. 2002; Cartron et al. 2004a; Kuwana et al. 2005; Certo et al. 2006; Kim et al. 2006; Gavathiotis et al. 2008; Czabotar et al. 2009; Gallenne et al. 2009; Kim et al. 2009; Merino et al. 2009; Du et al. 2010; Ren et al. 2010; Dai et al. 2011). Se ha sugerido que las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” activadoras y Bax y Bak podrían ser transitorias, siguiendo el llamado modelo “hit-and-run”, lo que justificaría las dificultades para su detección empleando los métodos clásicos de estudio de interacciones entre proteínas. Por ello nos planteamos utilizar la técnica de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC), que podría aportarnos ciertas ventajas frente a otras

metodologías. Una de las características de esta técnica es que los complejos formados por la complementación de los dos fragmentos de la proteína fluorescente son irreversibles (Kerppola 2008). Aunque esto limita su aplicación para estudios de dinámica de interacciones, en este caso esto podría resultar ventajoso para “capturar” los posibles complejos que se formaran entre las proteínas “sólo-BH3” y Bak y/o Bax.

Para analizar la capacidad de las proteínas Bim, PUMA y Noxa de unirse a las moléculas efectoras Bak y Bax, llevamos a cabo una serie de experimentos de transfección empleando las combinaciones adecuadas de los vectores mostrados en las Figuras 3.2 y 3.3 en células HeLa. Se siguió el protocolo explicado en el apartado 3.3.1 y los complejos formados por Complementación Bimolecular de Fluorescencia se analizaron por citometría de flujo, microscopía confocal y microscopía de fluorescencia “time-lapse”. Debido a la alta mortalidad observada cuando transfectábamos con las distintas parejas de proteínas proapoptóticas, se decidió tratar a las células previamente con el inhibidor general de caspasas, zVAD-fmk. De esta manera se conseguía preservar mejor la integridad de las células, lo cual nos permitía detectar y visualizar los complejos formados por BiFC. Además, los niveles de transfección obtenidos, determinados por el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de la mRFP, eran significativamente menores, no alcanzando siquiera valores del 10%. En estos experimentos, como ya se ha mencionado anteriormente, se redujo la cantidad de vectores transfectados a la mitad ( $1,5 \mu\text{g}/10^6$  células), para evitar la sobreexpresión de las proteínas en las células.

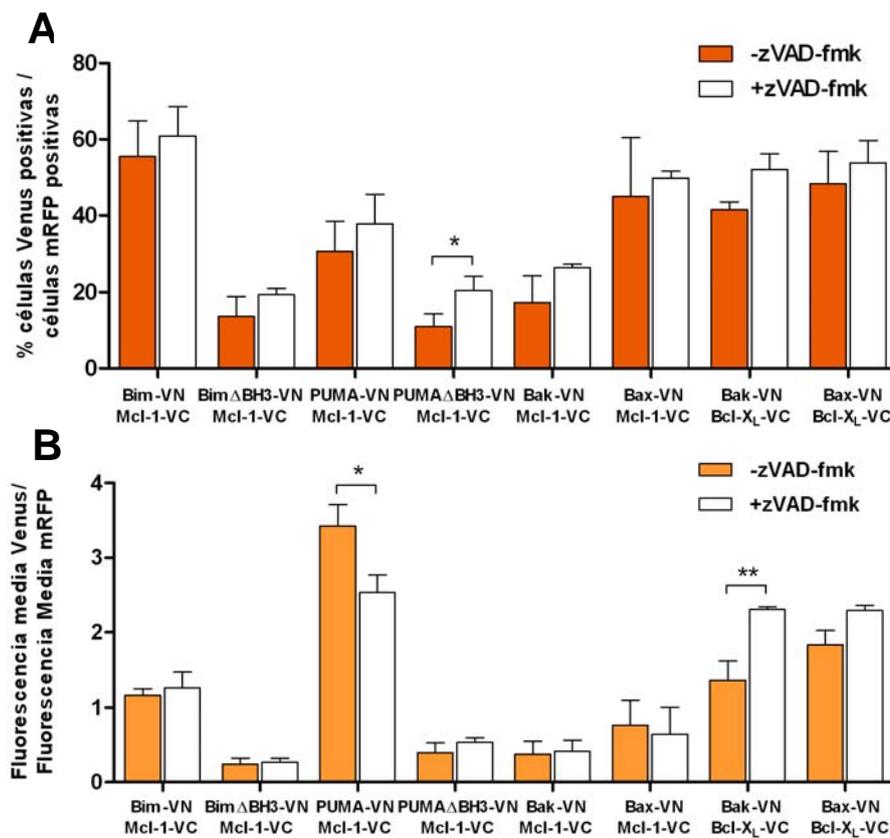
En la siguiente figura se muestran los datos de citometría de flujo obtenidos para las interacciones entre Bak/Bax y las proteínas “sólo-BH3” en presencia y en ausencia de zVAD-fmk. Se puede ver que en ausencia de zVAD-fmk el porcentaje de células que presentan complejos es muy pequeño, incluso por debajo del 5% de células transfectadas (Figura 4.38 A). Además, considerando que la transfección también se ve altamente reducida, este valor supone todavía un porcentaje menor de la población de células. Los complejos formados presentan una fluorescencia muy baja en comparación con los que se forman en presencia de zVAD-fmk (Figura 4.38 B). Destaca el caso de la interacción entre Bim y Bax, que a pesar de aumentar en presencia del inhibidor de caspasas, ya presenta valores elevados de porcentajes de células y de intensidades de fluorescencia de los complejos. Como se muestra en figuras posteriores (4.42 y 4.43) Bim y Bax interaccionan en el citosol de las células y posteriormente los complejos se translocan a las mitocondrias. Es posible que la

transfección de las células con esta pareja de proteínas no cause niveles tan altos de muerte celular y que esto permita visualizar los complejos formados.



**Figura 4.38** Análisis por citometría de flujo de las interacciones entre Bak/Bax y las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa en presencia o ausencia de zVAD-fmk. Los resultados son media  $\pm$  SD de entre tres y siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

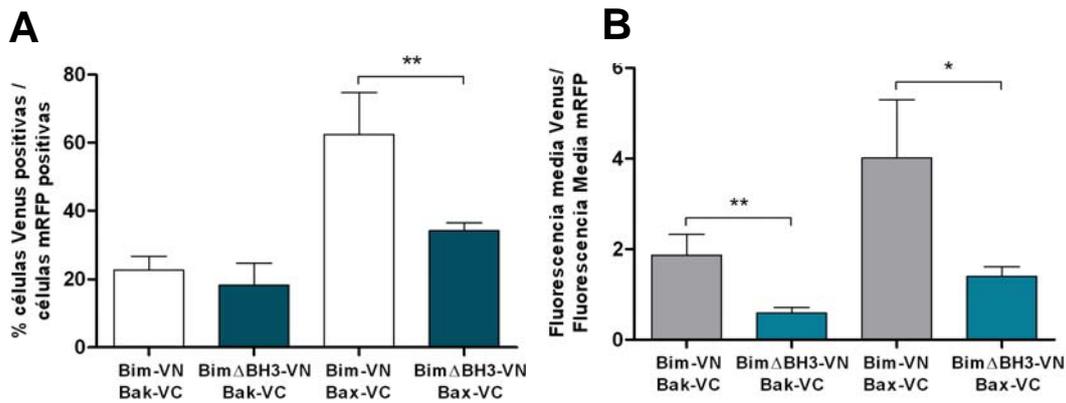
Al observar el acusado efecto del zVAD-fmk sobre las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” y Bak y Bax, se decidió estudiar si el mismo efecto ocurría con otras parejas de proteínas. Para ello, la interacción entre distintas combinaciones de proteínas se analizó en presencia de zVAD-fmk y se comparó con los resultados obtenidos en ausencia del mismo. En las gráficas de la Figura 4.39 se puede observar que la adición de zVAD-fmk no causa el aumento observado anteriormente. Se aprecia un ligero aumento de algunas interacciones en porcentaje de células o de intensidades de fluorescencia. Sin embargo, en la mayoría de casos no es estadísticamente significativo. Estos resultados permiten descartar la posibilidad de que la presencia de zVAD-fmk en el medio de cultivo esté favoreciendo la interacción artefactual entre las proteínas transfectadas.



**Figura 4.39** Análisis por citometría de flujo de las interacciones entre proteínas antiapoptóticas y proteínas “sólo-BH3” y Bak/Bax en presencia o ausencia de zVAD-fmk. Los resultados son media  $\pm$  SD de entre tres y siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

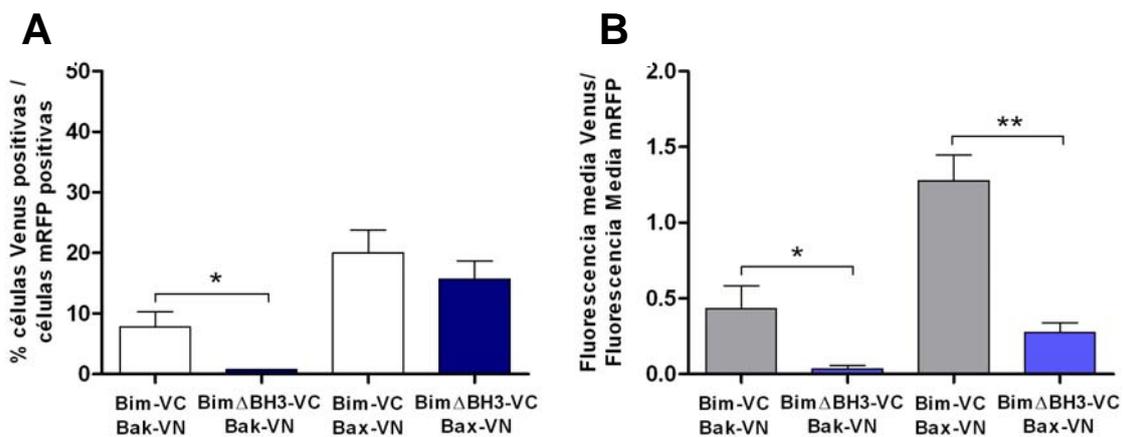
### 4.3.1 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” Bim con Bak y Bax.

Cuando se analizaron por BiFC las interacciones que Bim establece con Bak y Bax, se pudo detectar interacción con Bak en un 20% de las células transfectadas, mientras que con Bax alrededor del 60% de las células presentaban complejos fluorescentes (Figura 4.40 A). Los valores de intensidad media de fluorescencia de los complejos formados con Bax son también alrededor del doble de los formados con Bak (Figura 4.40 B), sugiriendo que estos complejos se forman con mayor eficiencia en las células en estas condiciones. La delección del dominio BH3 de Bim hace disminuir significativamente tanto el porcentaje de células fluorescentes (solamente observado en la interacción con Bax) como la intensidad de los complejos formados, subrayando el importante papel de este dominio en las proteínas “sólo-BH3”.



**Figura 4.40** Análisis de la interacción directa entre Bim y su mutante de delección del dominio BH3 y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

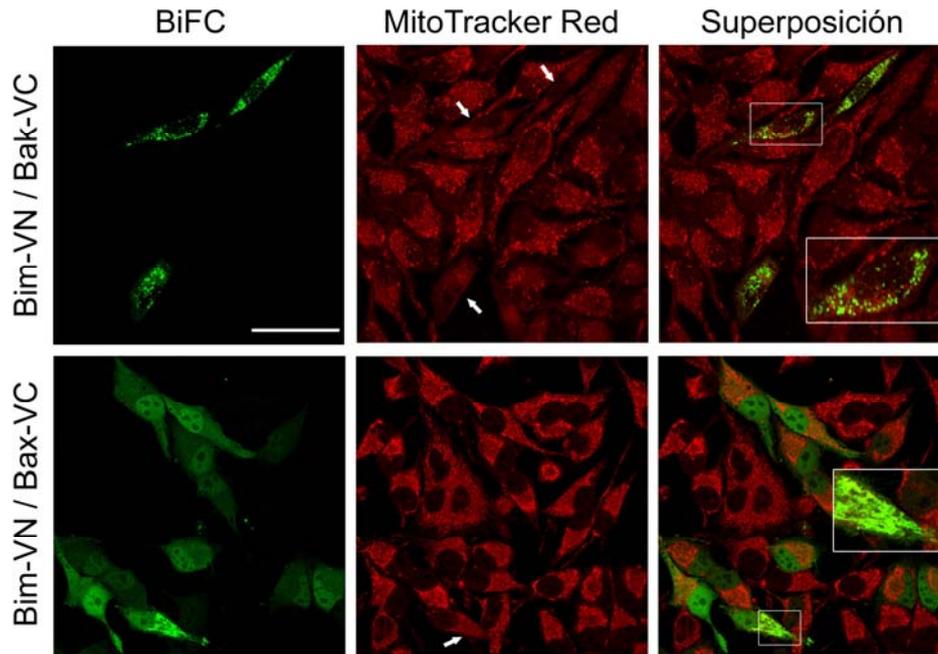
A continuación se estudiaron estas interacciones utilizando la segunda combinación de proteínas de fusión. De esta manera se puede comprobar los resultados obtenidos con las proteínas de fusión anteriormente empleadas. En la Figura 4.41 se puede observar que las interacciones de Bim con Bak/Bax siguen la misma tendencia que usando los primeros vectores (Figura 4.40), aunque los porcentajes de interacción (A) y el nivel de fluorescencia (B) son menores en este caso para ambas parejas. No obstante, la delección del dominio BH3 de Bim supone de nuevo una reducción importante de estas interacciones, indicando la implicación de este dominio en dichas uniones.



**Figura 4.41** Análisis de la interacción directa entre Bim y su mutante de delección del dominio BH3 y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo empleando el segundo conjunto de vectores. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Inicialmente se pensó que solamente la isoforma BimS era capaz de actuar como activador directo (Marani et al. 2002), pero más tarde se ha comprobado que las tres isoformas son capaces de hacerlo, aunque probablemente la interacción que establecen con las proteínas efectoras sea mucho más rápida y difícil de capturar por las técnicas bioquímicas convencionales (Merino et al. 2009). Además, se ha comprobado que la mutación puntual G156A, residuo perteneciente al dominio BH3 de Bim, rompe su interacción con Bax (Marani et al. 2002). También se ha detectado la unión de Bim a Bak en ausencia de lípidos, indicando la existencia de una interacción directa entre las proteínas (Dai et al. 2011).

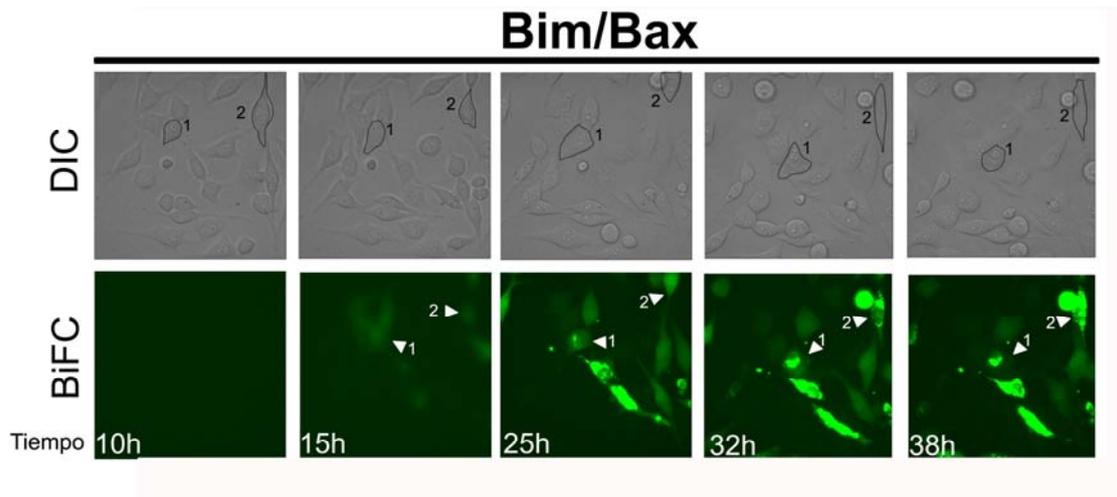
A continuación se analizó la localización subcelular de los complejos formados entre Bim y Bak/Bax en células HeLa con el primer conjunto de proteínas de fusión. Imágenes representativas de microscopía confocal se muestran en la Figura 4.42. Se puede observar que los complejos formados por Bak y Bim tienen una distribución punteada, lo cual sugiere que su localización sea mitocondrial. Además, las células que presentan complejos fluorescentes muestran un marcaje de MitoTracker Red más atenuado, lo cual podría estar relacionado con un potencial de membrana mitocondrial reducido (ver células marcadas con flechas). Como se ha indicado anteriormente esta caída del potencial mitocondrial es un evento frecuentemente relacionado con procesos de muerte celular y la reducción de la señal fluorescente de MitoTracker Red es un buen indicador de este proceso (Poot et al. 1996; Pendergrass et al. 2004). Más llamativo es el caso de la interacción de Bax con Bim, ya que los complejos fluorescentes tienen una localización predominantemente citosólica. No obstante, algunas células parecen presentar una distribución parcialmente mitocondrial, como se puede ver en la ampliación de una sección celular, que corresponde a la célula señalada con una flecha. Según se observa en las fotografías los complejos de la pareja Bim/Bax con distribución citosólica corresponden a células con morfología sana, mientras que la distribución parcialmente mitocondrial corresponde a células cuyo marcaje con MitoTracker Red se ve más atenuado, indicando caída del potencial mitocondrial.



**Figura 4.42 Localización de los complejos Bim/Bak y Bim/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por las proteínas Bak y Bax con Bim. Escala, 50 $\mu$ m.

Nuestros resultados parecían indicar que los complejos Bim/Bax podrían formarse en el citosol y translocarse posteriormente a las mitocondrias. Para confirmar esta hipótesis se decidió visualizar a lo largo del tiempo cómo ocurría la formación de los complejos desde el momento de la transfección de las células. Para ello, se utilizó un microscopio de fluorescencia multidimensional Leica AF6000 LX System con una cámara termostatazada acoplada que mantiene las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La adquisición de imágenes se llevó a cabo a intervalos regulares en planos elegidos al azar. En las siguientes figuras se muestran unas secuencias de imágenes representativas, tanto de la fluorescencia correspondiente a la señal de BiFC como de luz blanca DIC, a distintos tiempos tras la transfección. Las secuencias de imágenes completas han sido a su vez procesadas en forma de vídeo, los cuales se adjuntan en el material complementario.

En las imágenes de la Figura 4.43 se puede observar que Bim y Bax interaccionan inicialmente en el citosol de las células. Se puede apreciar que a tiempos más largos los complejos van translocándose probablemente a las mitocondrias ya que la fluorescencia verde pasa a tener una distribución mucho más punteada.

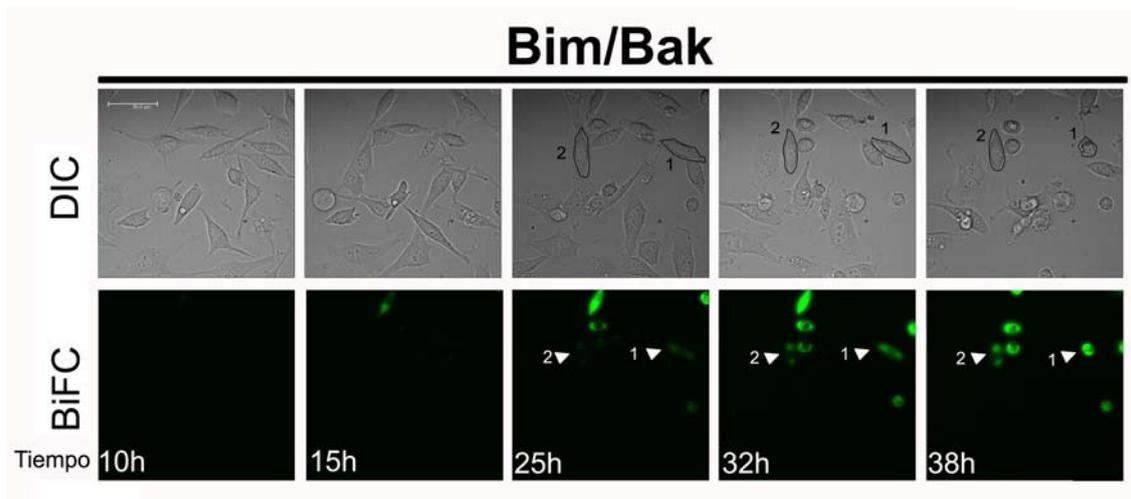


**Figura 4.43** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las células se transfirieron con la pareja Bim/Bax y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección. (Ver los vídeos correspondientes a esta serie de imágenes: MovBimBax\_DIC y MovBimBax\_BiFC en el DVD adjunto).

La interacción inicial entre Bim y Bax en el citosol y posterior translocación a las mitocondrias estaría en desacuerdo con algunos autores que proponen que las proteínas “sólo-BH3” activadoras que residen en el citosol, primero se translocan a la mitocondria para, posteriormente interaccionar con Bax/Bak y desencadenar su activación (Lovell et al. 2008; Shamas-Din et al. 2010). No obstante también se ha sugerido que solamente las moléculas de Bax que estén cercanas a la membrana mitocondrial externa cuando sean activadas por una proteínas “sólo-BH3” podrán completar su activación e inserción en ésta, lo cual no implica que Bax o las proteínas activadoras deban estar insertadas en dichos orgánulos (Wilfling et al. 2012). Además, se ha descrito que Bim puede estar asociada a la subunidad LC8 de la proteína motora dineína en el citosol y que se transloca a las mitocondrias al activarse la apoptosis (Puthalakath et al. 1999). Por lo tanto es posible que las técnicas utilizadas habitualmente para estudiar interacciones no permitan detectar esta interacción en el citosol, ya que los complejos son rápidamente direccionados hacia las mitocondrias. Recientemente se ha descrito que Bax y Bid se asocian en el citosol de las células y se translocan juntos hacia la mitocondria (Yivgi-Ohana et al. 2011). Estos autores emplean un sistema equivalente al nuestro para la visualización de complejos fluorescentes entre proteínas. También se ha descrito que Bax se

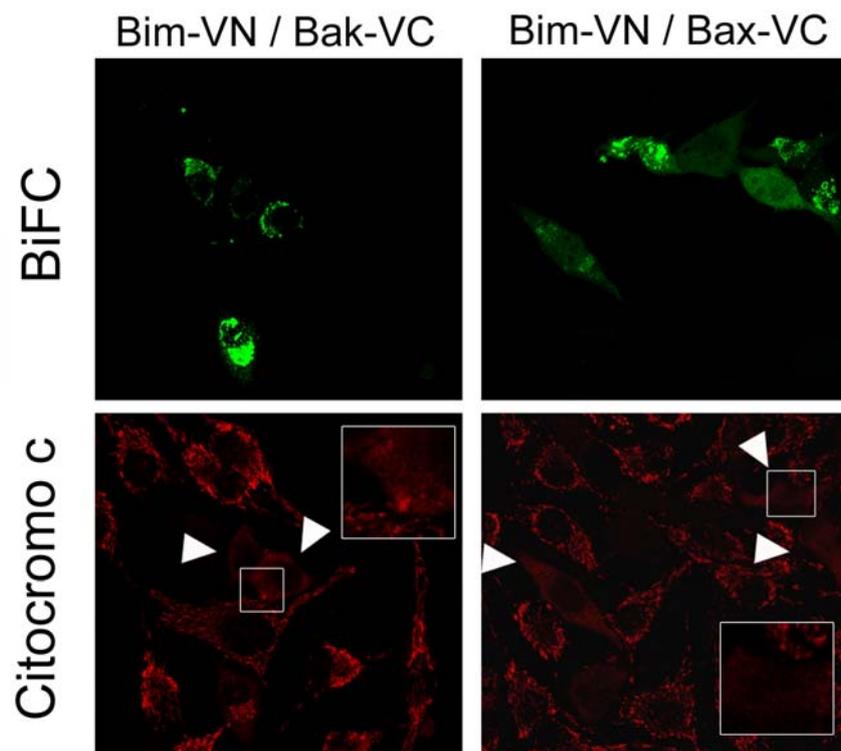
transloque del citosol a la mitocondria como consecuencia de un colapso en el potencial de membrana mitocondrial. Su translocación promovería entonces la desintegración de estos orgánulos, la salida de citocromo c y activación de caspasas (Smaili et al. 2001).

Como se puede apreciar en la secuencia de fotografías de la Figura 4.44 Bim y Bak interaccionan en un porcentaje menor de células que Bax y Bim. Además, los complejos entre las proteínas muestran una fluorescencia punteada, sugiriendo que se forman en las mitocondrias de las células, coincidiendo con la localización Bak en estos orgánulos (Wei et al. 2000). No es posible determinar la localización de estos complejos mediante esta técnica, sin embargo sí se puede ver que la fluorescencia no se distribuye de manera difusa por el citosol de la célula. Se puede observar además que algunas de las células que presentan fluorescencia (ver célula 1) a lo largo del tiempo van adquiriendo una morfología mucho más redondeada, probablemente precediendo la muerte celular. En las fotografías de microscopía confocal, correspondientes a las 24 horas después de la transfección, ya podíamos apreciar la caída de potencial mitocondrial de las células en las que Bim y Bak estaban formando complejos (Figura 4.42).



**Figura 4.44** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las células se transfectaron con la pareja Bim/Bak y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección. (Ver los vídeos correspondientes a esta serie de imágenes: MovBimBak\_DIC y MovBimBak\_BiFC en el DVD adjunto).

Una vez detectada la unión de Bim a Bak y Bax se quiso analizar si estas interacciones desencadenaban algún evento apoptótico más allá de la caída de potencial de membrana mitocondrial mencionado anteriormente. Ya se ha descrito en otros momentos de este trabajo la irreversibilidad de los complejos formados por BiFC (Kerppola 2008). Esta característica, que resulta ventajosa debido a que permite visualizar interacciones transitorias y probablemente débiles, supone en este caso un gran impedimento. Al no poderse dar la disociación de los complejos fluorescentes no es posible estudiar si las moléculas de Bak y Bax a las que se han unido las proteínas “sólo-BH3” pueden continuar la ruta apoptótica. No obstante, se intentó visualizar algún evento posterior a la activación de Bak y Bax, como es la salida de citocromo c de las células. Para ello, células que habían sido transfectadas con las distintas parejas de Bim-VN/Bak-VC y Bim-VN/Bax-VC se fijaron y permeabilizaron para llevar a cabo el marcaje intracelular de citocromo c (apartado 3.5.1). La siguiente figura muestra algunas fotografías de microscopía confocal representativas.



**Figura 4.45** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con las parejas de proteínas proapoptóticas Bim-VN/Bak-VC y Bim-VC/Bax-VC en las que se ha hecho marcaje intracelular de citocromo c (Alexa 568). Las flechas señalan algunas células en las que el marcaje es difuso, indicativo de la salida de citocromo c de las células.

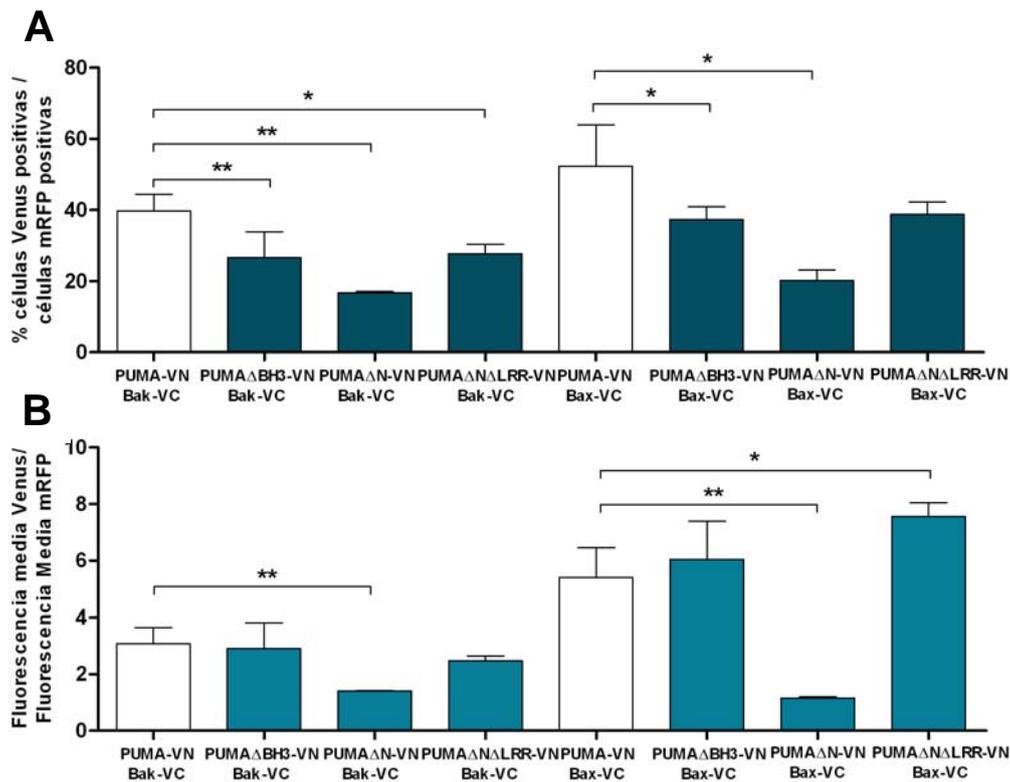
Se puede ver en las fotografías que en las células que no presentan fluorescencia verde correspondiente a complejos de BiFC, el marcaje del citocromo c tiene aspecto mitocondrial. Sin embargo, en la mayoría de células en las que se observa interacción Bim con Bak o Bax, el marcaje del anticuerpo es mucho más difuso por el citosol de las células (células marcadas con puntas de flecha). Este dato estaría indicando que ha habido una salida de dicho factor apoptogénico del espacio intermembrana mitocondrial al citosol celular.

### **4.3.2 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” PUMA con Bak y Bax.**

Hay diferentes datos en la literatura a favor de que existan más proteínas con papel activador de Bak y Bax, además de Bim y tBid. En un estudio genético reciente se ha mostrado que la ausencia simultánea de las proteínas Bid, Bim y PUMA causa un desarrollo aberrante en ratones en cuanto a defectos en la apoptosis así como resistencia a estímulos apoptóticos como el tratamiento con dexametasona o etopósido o la deprivación de citoquinas en experimentos *ex vivo* (Ren et al. 2010). Estos resultados apoyan el papel de estas tres proteínas “sólo-BH3” como activadores directos de Bak y Bax.

Por otra parte, un trabajo de Du y colaboradores considera que si Bid y Bim fueran los únicos activadores de Bak/Bax, el fenotipo de ratones DKO Bim/ Bid debería ser igual al de DKO Bak/Bax (Du et al. 2010). Sin embargo, las células derivadas de estos ratones no presentan ningún defecto apoptótico, por lo que estos autores concluyen que otras proteínas “sólo-BH3” puedan estar actuando como activadores. Además proponen que, de hecho, todas las proteínas sólo BH3 puedan tener esta capacidad en mayor o menor grado, habiendo establecido que Bid y Bim serían las de mayor actividad, seguidas de Noxa y Bmf; después estarían PUMA, Bik y Hrk y finalmente Bad que no presentaría actividad como activadora directa en las condiciones de su trabajo. No obstante, los autores no descartan que existan diferencias en estas actividades al utilizar las proteínas completas, ya que sus estudios están basados en liposomas empleando los péptidos derivados de los dominios BH3 aislados.

Nuestros datos de experimentos de BiFC respecto a PUMA también apoyan el papel de esta proteína como activadora directa de Bak y Bax (Figura 4.46).



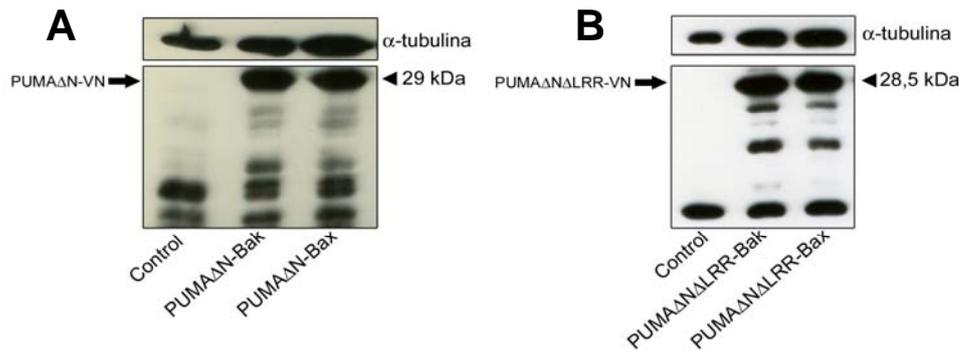
**Figura 4.46 Análisis de la interacción directa entre PUMA y sus diferentes mutantes de delección y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Podemos observar porcentajes elevados de células positivas para la fluorescencia de Venus, que alcanzan valores del 40 y de más del 50% al cotransfectar las células con Bak y Bax, respectivamente (Figura 4.46 A). Ambos parámetros estudiados, porcentaje de células (A) e intensidad de fluorescencia de los complejos (B), son más elevados en las interacciones de PUMA con Bak y Bax que de Bim con las mismas proteínas. Los complejos que se forman entre estas proteínas por BiFC emiten una fluorescencia de intensidad elevada que no se reduce de manera significativa al deleccionar el dominio BH3 de PUMA (Figura 4.46 B), aunque sí se observa una disminución significativa del porcentaje de células fluorescentes (Figura 4.46 A). Esto podría indicar la existencia de una interacción entre PUMA y Bak/Bax independiente del dominio BH3 de la primera. Por otra parte, la delección del dominio BH3 de PUMA hace que se pierda su actividad proapoptótica (Nakano and Vousden 2001; Yu et al. 2001) (Figura 4.8). Por lo tanto, se podría pensar que en caso de se estuviera dando la interacción a través de una zona distinta del dominio BH3, sería necesaria la presencia

de este dominio para inducir el cambio conformacional de Bak y Bax y que éstas se activaran.

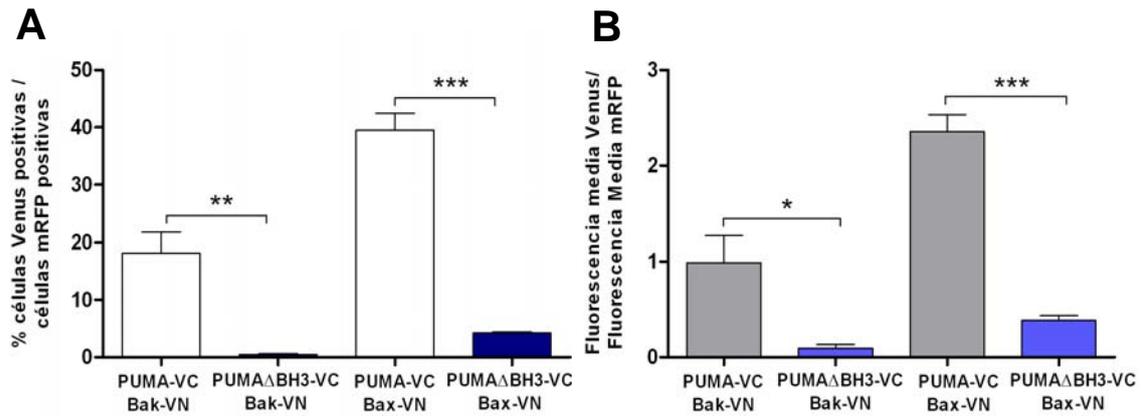
En un trabajo publicado por Gallene y colaboradores observan que PUMA está implicado en la inducción de muerte celular por apoptosis tras el tratamiento de la línea celular de cáncer colorrectal HCT116 con ABT-737, un potente inhibidor de la unión de proteínas "sólo-BH3" a antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (Gallenne et al. 2009). Estos autores ven un aumento de la interacción entre Bax y PUMA al tratar con ABT-737 a la vez que disminuye la interacción de estas proteínas con Bcl-X<sub>L</sub>. Sin embargo, al silenciar Bak, no ven ningún efecto en la inducción de muerte por ABT-737, lo cual sugiere que sea mucho más importante la interacción de PUMA con Bax. Estos datos estarían de acuerdo con la mayor frecuencia de interacción de PUMA con Bax respecto a Bak que nosotros observamos por BiFC.

De nuevo, los datos obtenidos con las proteínas PUMA $\Delta$ N y PUMA $\Delta$ N $\Delta$ LRR resultan interesantes, ya que al deleccionar la zona N-terminal de PUMA disminuye mucho tanto los porcentajes como las intensidades de interacción. Esto sugeriría que este dominio podría estar implicado en la unión, pero no en la activación, a las proteínas efectoras Bak y Bax. Resulta interesante también que la deleción de los aminoácidos LRR del dominio BH3 en la isoforma de PUMA que también tiene deleccionado el dominio N-terminal, hace que vuelva a aumentar las interacciones tanto con Bak como con Bax, llegando a superar incluso en intensidad a los complejos formados con Bax (Figura 4.46 B). Se analizó el nivel de expresión de las proteínas truncadas PUMA $\Delta$ N y PUMA $\Delta$ N $\Delta$ LRR al transfectarlas con las proteínas multidominio Bak y Bax para ver si la disminución de interacción observada con la primera proteína mutada se debía a una menor expresión de ésta. Ya se había comprobado que el mutante de deleción del dominio BH3 de PUMA se expresaba correctamente con las diferentes parejas (Figura 4.4 B). En la Figura 4.47 se puede observar que estos otros dos mutantes de PUMA presentan niveles de expresión muy similares a los de la proteína endógena. Esto permite pensar que ese dominio N-terminal de PUMA, ausente en estas formas truncadas de la proteína, pueda estar involucrado en su interacción con las proteínas efectoras Bak y Bax, aunque sea de manera indirecta.



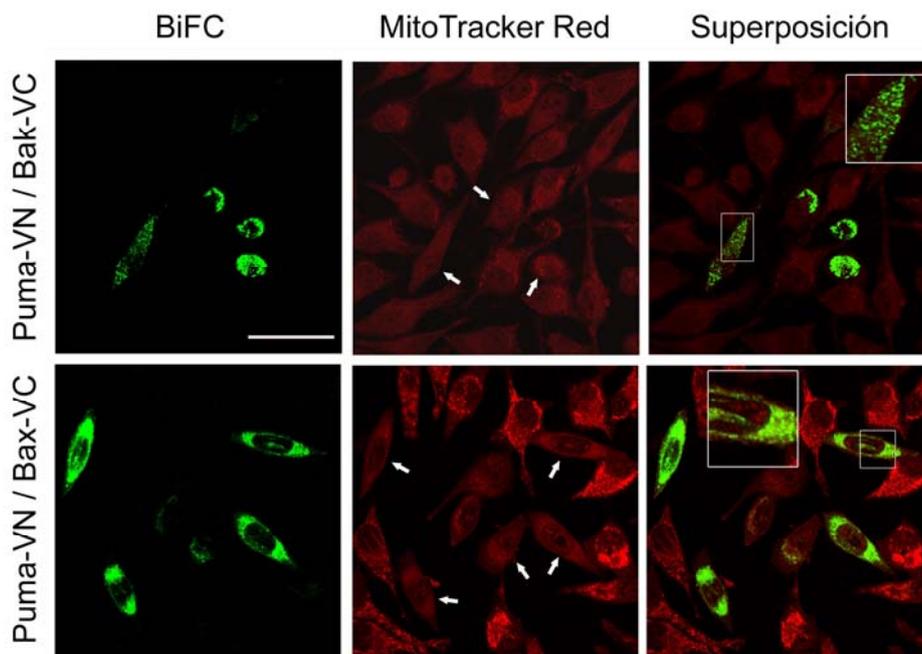
**Figura 4.47 Nivel de expresión de las proteínas derivadas de PUMA, PUMAΔN (A) y PUMAΔNΔLRR (B), cuando se transfectan con las parejas Bak y Bax.** El peso molecular de la proteína de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VN ~ 17,5 KDa).

Al analizar la formación de complejos con la segunda combinación de vectores observamos el mismo efecto que con Bim. Los complejos fluorescentes formados por interacción de la proteína PUMA con las proteínas proapoptóticas multidominio se observan en un menor porcentaje (Figura 4.48 A) y con una intensidad media de fluorescencia menor (Figura 4.48 B) respecto a los resultados mostrados en la Figura 4.46. Pero de nuevo, se puede ver que la interacción con Bax ocurre en un porcentaje alrededor del doble de la observada con Bak y que los complejos formados tienen también una mayor fluorescencia. Además, se observa una reducción significativa del porcentaje de células con complejos fluorescentes y de los valores de fluorescencia cuando PUMA carece de su dominio BH3. Esta reducción no se observaba cuando las células eran transfectadas con el primer conjunto de vectores, por lo que no podemos descartar que la ausencia de señal fluorescente en este caso sea debida a impedimentos estéricos que imposibiliten la complementación de los fragmentos de la proteína Venus.



**Figura 4.48** Análisis de la interacción directa entre PUMA y su mutante de delección del dominio BH3 y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo empleando el segundo conjunto de vectores. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

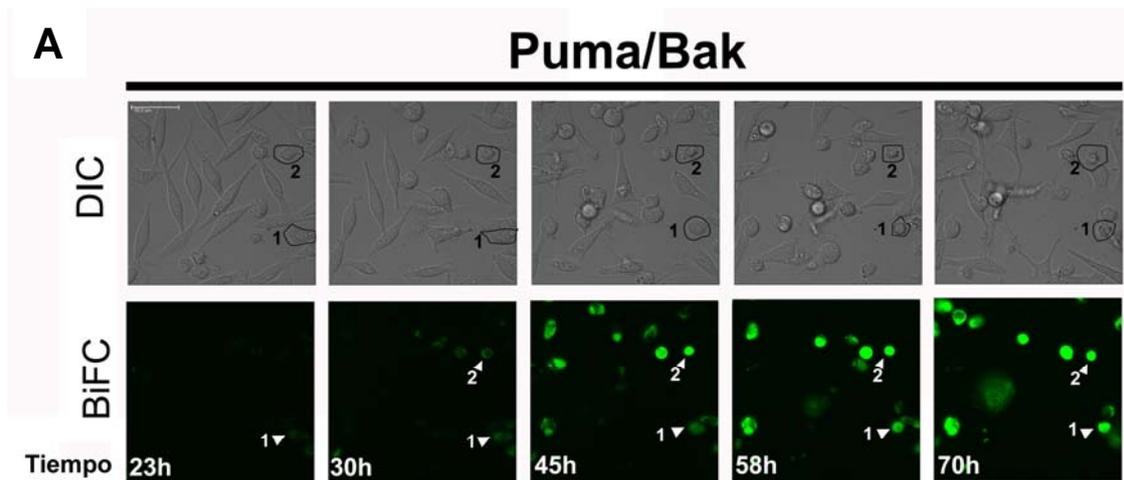
Las imágenes de microscopía confocal muestran que los complejos formados por BiFC entre PUMA y Bak/Bax presentan un patrón de distribución punteada (Figura 4.49). Como se observa en las imágenes superpuestas la fluorescencia verde colocaliza con el marcaje mitocondrial obtenido con la sond MitoTracker Red. Estos datos estarían de acuerdo con la localización mitocondrial de PUMA descrita anteriormente (Yee and Vousden 2008).

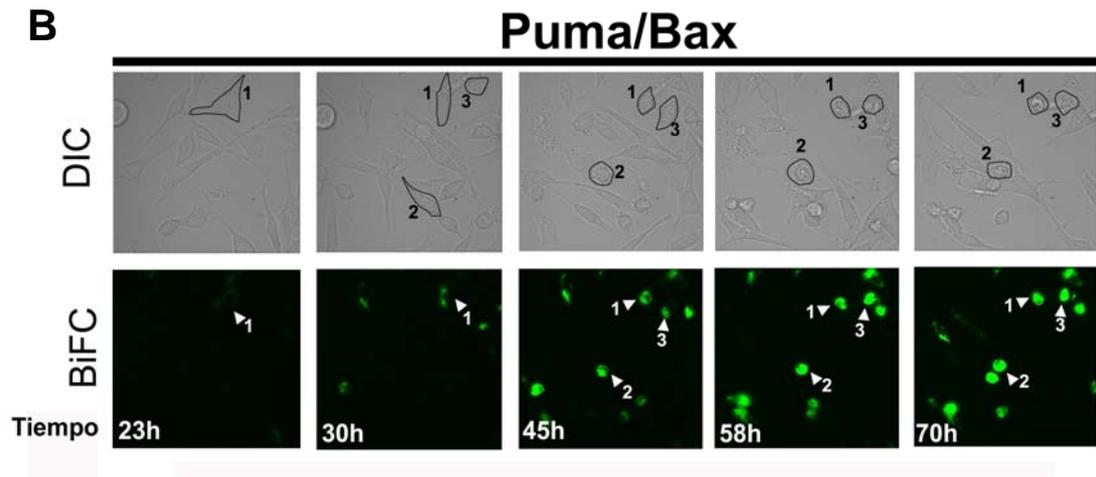


**Figura 4.49** Localización de los complejos PUMA/Bak y PUMA/Bax. Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por las proteínas Bak y Bax con PUMA. Escala, 50 $\mu$ m.

Se puede apreciar en las fotografías anteriores que las células que presentan complejos fluorescentes muestran además un marcaje de MitoTracker Red más débil, en comparación a células donde no hay complejos fluorescentes. Probablemente la interacción entre estas parejas de proteínas proapoptóticas induce caída de potencial mitocondrial en las células, evento frecuentemente relacionado con procesos de muerte celular.

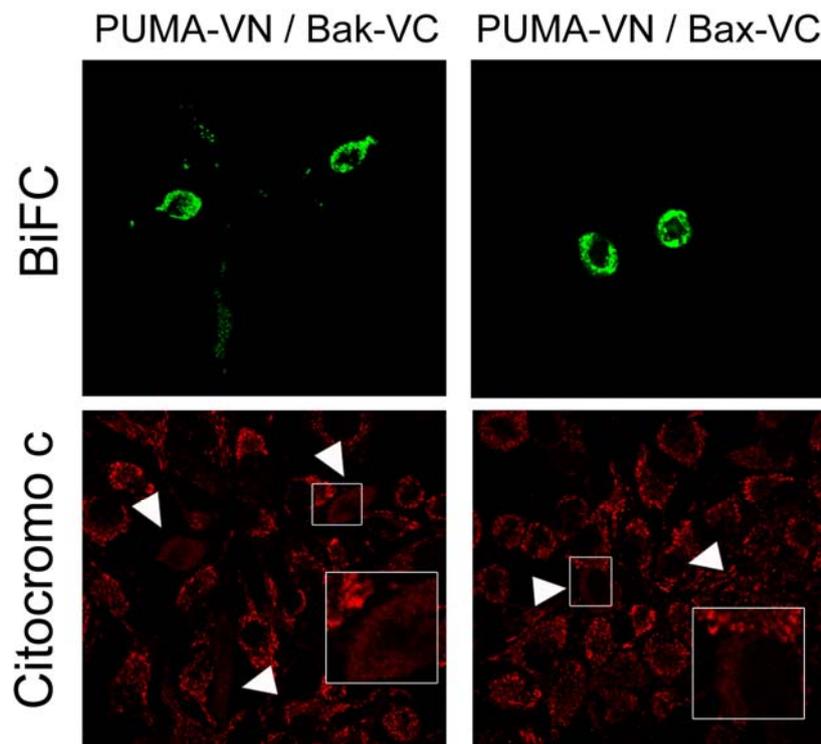
En las fotografías de microscopía “time-lapse” de la Figura 4.50 se puede observar de nuevo que los complejos entre PUMA y las proteínas proapoptóticas Bak (A) y Bax (B) aparecen en las células con una fluorescencia punteada, sugiriendo que la interacción está ocurriendo probablemente en las mitocondrias de las células. Además, se puede observar claramente que muchas de las células en las que se ven los complejos fluorescentes van adquiriendo morfología apoptótica a tiempos largos tras la transfección. Incluso en algunas células a tiempos largos se pueden visualizar los llamados “blebs” o burbujas apoptóticas ya que el zVAD-fmk añadido al principio probablemente ha perdido su actividad a esos tiempos. Es importante mencionar que, especialmente en los últimos tiempos, es difícil visualizar la fluorescencia de algunas células puesto que éstas van adquiriendo una morfología mucho más redondeada que imposibilita su enfoque en el microscopio.





**Figura 4.50** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las células se transfirieron con las parejas PUMA/Bak (A) y PUMA/Bax (B) y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección. (Ver los vídeos correspondientes a esta serie de imágenes: MovPUMABak\_DIC; MovPUMABak\_BiFC; MovPUMABax\_DIC y MovPUMABax\_BiFC en el DVD adjunto).

Como se ha mostrado anteriormente para Bim, se llevó a cabo un marcaje intracelular de citocromo c, para visualizar la salida de este factor apoptogénico en las células transfectadas con PUMA-VN y Bak/Bax-VC (Figura 4.51). Se observa un marcaje más atenuado en aquellas células que presentan complejos entre las proteínas proapoptóticas anteriores, lo cual indicaría que estas interacciones desencadenan la activación de la ruta apoptótica.

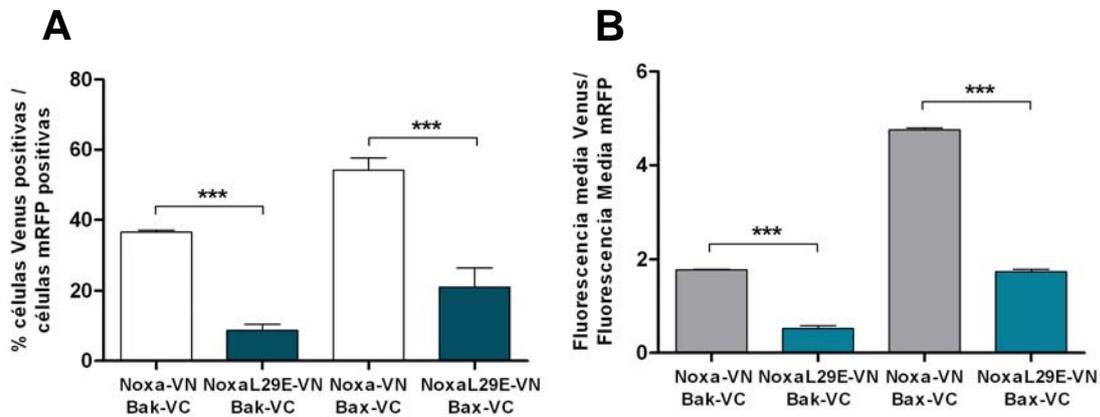


**Figura 4.51** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con las parejas de proteínas proapoptóticas PUMA-VN/Bak-VC y PUMA-VC/Bax-VC en las que se ha hecho marcaje intracelular de citocromo c (Alexa 568). Las flechas señalan algunas células en las que el marcaje es difuso, indicativo de la salida de citocromo c de las células.

### 4.3.3 Interacciones de la proteína “sólo-BH3” Noxa con Bak y Bax.

La proteína “sólo-BH3” Noxa ha sido considerada durante mucho tiempo como proteína sensibilizadora, al no haberse podido detectar una interacción directa con las proteínas multidominio Bax y Bak. Pero recientemente algunos trabajos han propuesto que Noxa pueda tener capacidad de activar a Bak y Bax mediante unión transitoria pero directa a éstas (Du et al. 2010; Dai et al. 2011). Analizando mediante la técnica BiFC las interacciones entre Noxa y las proteínas efectoras Bak/Bax, se pudo comprobar que, efectivamente Noxa era capaz de unirse de manera eficiente a ambas proteínas. Las interacciones se han detectado en porcentajes de células elevados (Figura 4.52 A) y los complejos fluorescentes presentan una intensidad elevada (Figura 4.52 B), comparables a los obtenidos con Bim o PUMA (Figuras 4.40 y 4.46). La sustitución del residuo conservado del dominio BH3 de Noxa leucina 29 por un ácido glutámico hizo disminuir de manera significativa su interacción con ambas proteínas. Estos datos concuerdan perfectamente con la disminución de interacción

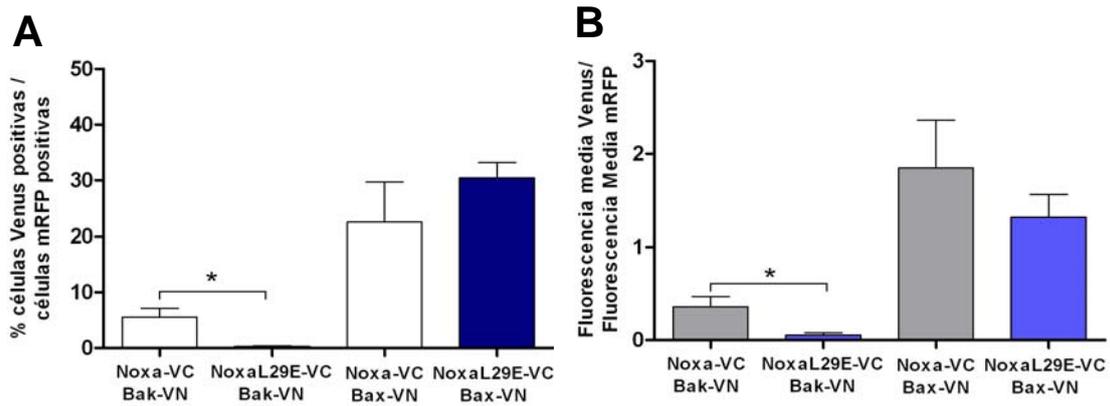
con Bak observada anteriormente para el mismo mutante (Dai et al. 2011). También otros autores han sugerido que la mutación de tres residuos conservados del dominio BH3 de Noxa, entre ellos la leucina 29, por tres glutámicos inhiben la capacidad de Noxa de inducir la oligomerización de Bak (Pang et al. 2012).



**Figura 4.52 Análisis de la interacción directa entre Noxa y su mutante puntual L29E y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

El papel de Noxa como activador directo explicaría la observación de que unas 30.000 moléculas de Noxa por célula sigan teniendo efecto citotóxico a pesar de que los miembros antiapoptóticos se encuentren en la célula con una abundancia de 3-10 veces mayor (Smith et al. 2011).

Cuando se analizaron las interacciones entre Noxa y Bak y Bax empleando el segundo conjunto de vectores generado observamos el mismo efecto (Figura 4.53). Parece ser que la fusión de las proteínas “sólo-BH3” al fragmento carboxilo de Venus (VC) hace disminuir de forma importante sus interacciones con Bak y Bax, fusionadas al fragmento VN. La reducción es en los tres casos más importante en el caso de Bak. Además, la mutación de un solo aminoácido del dominio BH3 de Noxa, L29E, no es capaz de reducir la interacción con Bax. Este resultado probablemente indica que ésta es una interacción estable en la que participan diferentes residuos de ambas proteínas y la mutación de uno solo de éstos no es suficiente para inhibir de manera eficiente la formación de complejos fluorescentes.

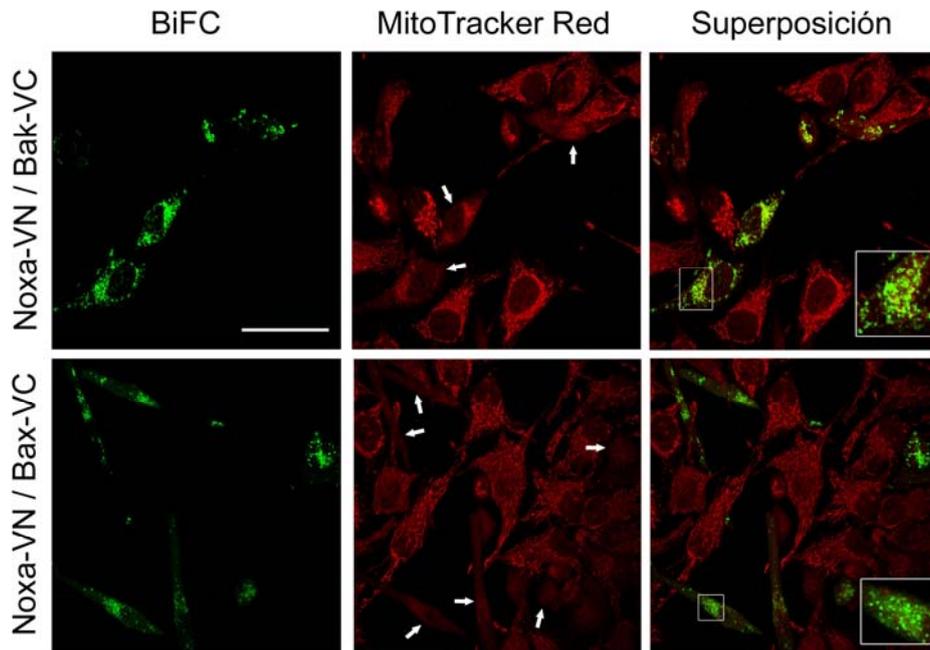


**Figura 4.53 Análisis de la interacción directa entre Noxa y su mutante NoxaL29E y las proteínas proapoptóticas Bak y Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo empleando el segundo conjunto de vectores.** Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

De forma general las interacciones detectadas con el segundo bloque de proteínas de fusión reproducen los resultados obtenidos con el primer conjunto de vectores. Sin embargo, cabe destacar que la formación de complejos por complementación de fluorescencia parece ser menos eficiente cuando se emplea el segundo conjunto de vectores. No podemos descartar posibles efectos estéricos que estén impidiendo la complementación de los fragmentos de la proteína Venus. Además, es posible también que las proteínas transfectadas puedan establecer interacciones con las endógenas, lo cual no podríamos detectar. Las diferencias observadas en el estudio de estas interacciones indicaría la necesidad de probar las diferentes combinaciones de vectores para cada pareja de proteínas. Esta consideración sería de especial importancia en caso de ausencia de señal fluorescente, ya que los complejos no detectados con determinadas proteínas de fusión podrían estar favorecidos empleando otras combinaciones de proteínas.

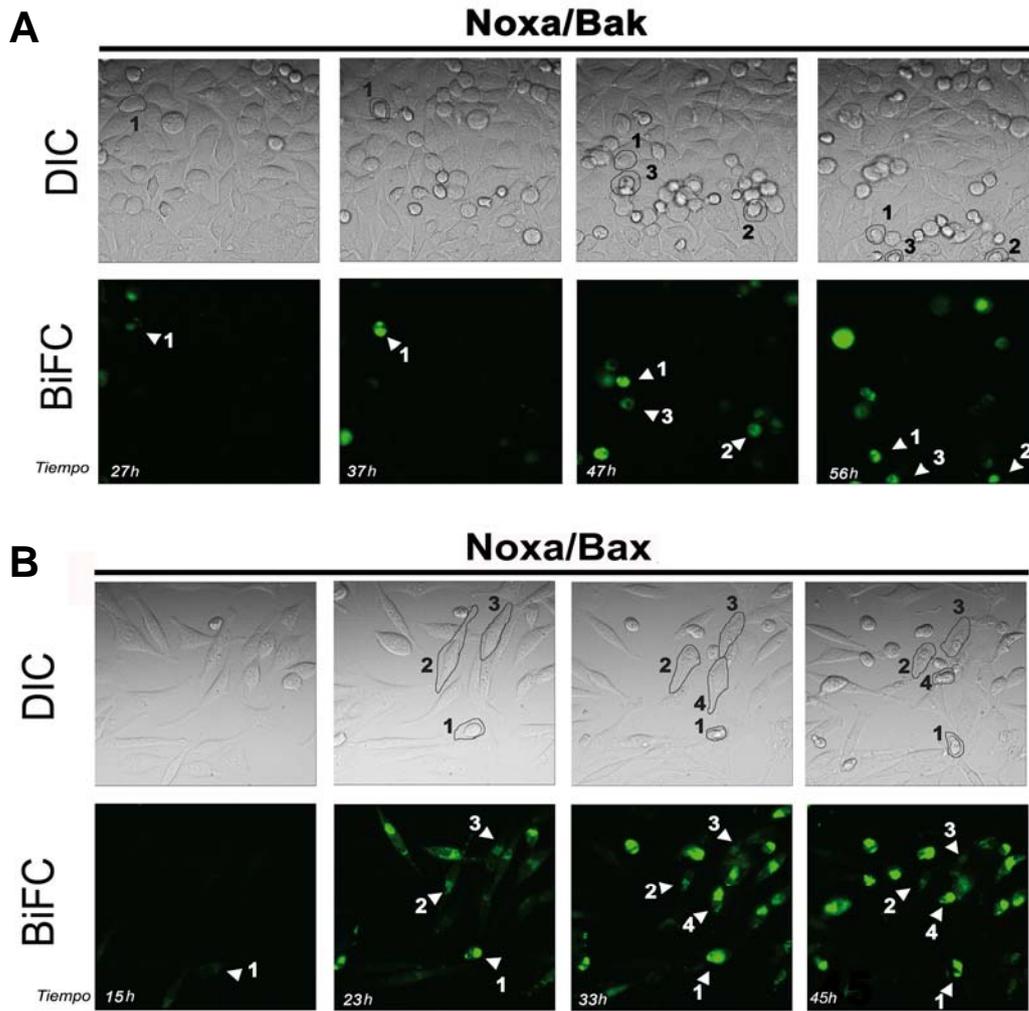
Al visualizar las interacciones anteriores por microscopía confocal se observa que los complejos de Noxa con Bak y Bax tienen una distribución punteada, lo cual sugiere que tengan localización mitocondrial (Figura 4.54). En la imagen superpuesta se observa una colocalización parcial de la fluorescencia de los complejos con dichos orgánulos. Además, como ocurre con las otras parejas de proteínas “sólo-BH3” y Bak/Bax, las células que presentan fluorescencia verde correspondiente a BiFC muestran un marcaje de MitoTracker Red difuso (flechas). Este dato estaría indicando

caída o reducción de potencial de membrana mitocondrial, como consecuencia de la interacción entre estas parejas de proteínas proapoptóticas.



**Figura 4.54 Localización de los complejos Noxa/Bak y Noxa/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por las proteínas Bak y Bax con Noxa. Escala, 50 $\mu$ m.

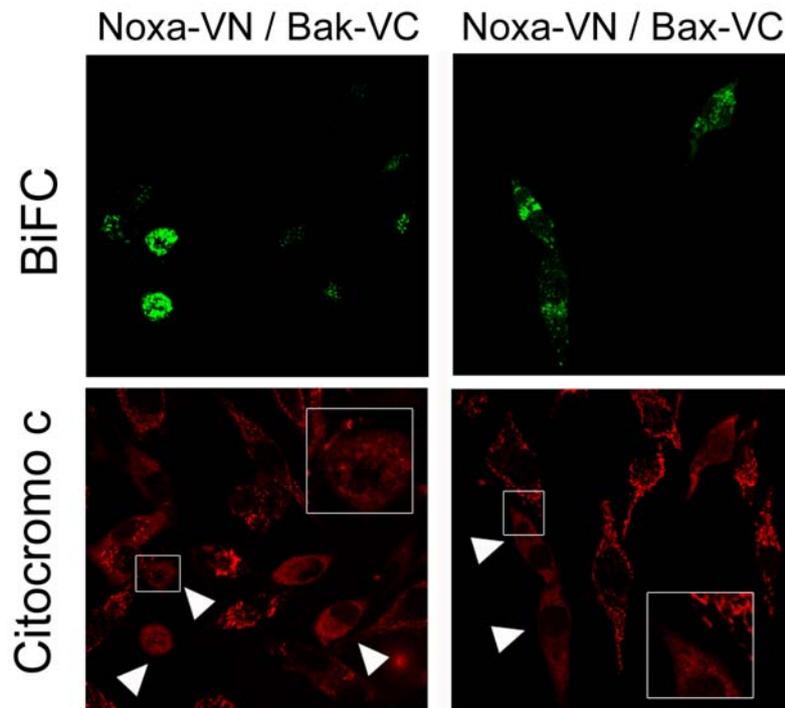
A continuación se visualizaron las células transfectadas con estas parejas a lo largo de tiempo por microscopía “time-lapse” (Figura 4.55). Se pudo apreciar la aparición de fluorescencia correspondiente a las interacciones con un patrón punteado, sugiriendo que los complejos se localizan en las mitocondrias de las células, como ya se había observado por microscopía confocal (Figura 4.54). También se pudo visualizar en este caso que la asociación de Noxa a las proteínas efectoras Bak (Figura 4.55 A) y Bax (B) va seguida en el tiempo de la aparición de un fenotipo apoptótico de muchas células, en concordancia con la caída de potencial visto en las fotografías de microscopía confocal a las 24 horas de la transfección (Figura 4.54).



**Figura 4.55** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las células se transfirieron con las parejas Noxa/Bak (A) y Noxa/Bax (B) y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección. (Ver los vídeos correspondientes a esta serie de imágenes: MovNoxaBak\_DIC; MovNoxaBak\_BiFC; MovNoxaBax\_DIC y MovNoxaBax\_BiFC en el DVD adjunto).

Finalmente se realizó el inmunomarcado de citocromo c para ver si la interacción de Noxa con Bak/Bax desencadenaba algún evento apoptótico además de la caída de potencial mitocondrial mencionada anteriormente. Como se observa en las fotografías de microscopía confocal de la figura siguiente, las células que presentan complejos de Noxa con las proteínas Bak o Bax muestran una fluorescencia difusa en el marcaje de citocromo c. Por el contrario, aquellas células que en las que no se detectan complejos correspondientes a BiFC, el marcaje de citocromo tiene un aspecto mitocondrial. Este

resultado estaría indicando que hay un progreso en la ruta apoptótica mitocondrial, generado a partir de la interacción de Noxa con las proteínas efectoras Bak/Bax.

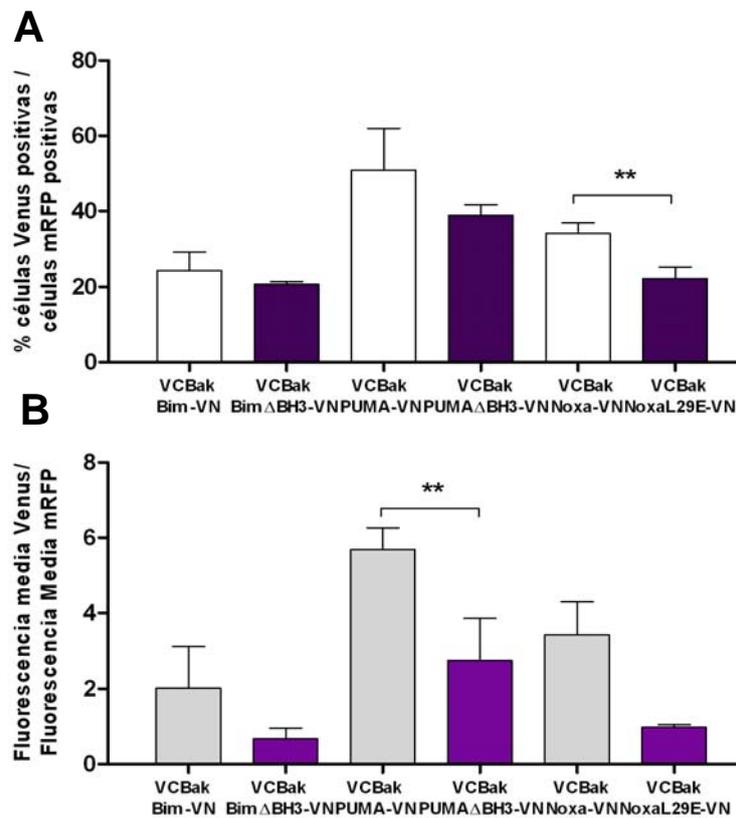


**Figura 4.56** Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con las parejas de proteínas proapoptóticas Noxa-VN/Bak-VC y Noxa-VC/Bax-VC en las que se ha hecho marcaje intracelular de citocromo c (Alexa 568). Las flechas señalan algunas células en las que el marcaje es difuso, indicativo de la salida de citocromo c de las células.

#### 4.3.4 Interacciones de las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con la proteína de fusión VC-Bak.

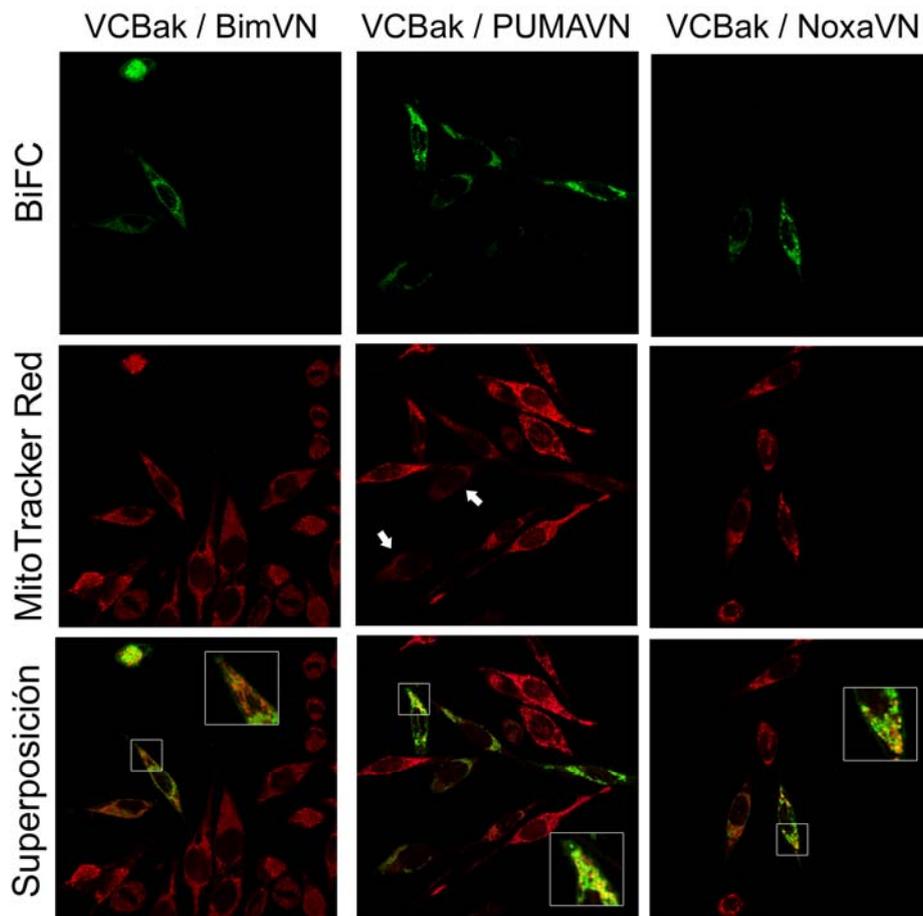
La proteína proapoptótica Bak se encuentra de manera constitutiva anclada a la membrana mitocondrial externa a través de su dominio C-terminal (Wei et al. 2000; Ferrer et al. 2012). Como se ha descrito anteriormente, los constructos que se generaron para los experimentos de BiFC presentan el fragmento correspondiente de la proteína Venus en el extremo C-terminal de la proteína de interés. Por esta razón decidimos, como en el caso de Bcl-X<sub>L</sub>, generar una nueva proteína de fusión en la que el fragmento VC quedara fusionado al extremo N-terminal de Bak. Para ello se llevó a cabo el procedimiento detallado en el apartado 3.2.7.4 de Materiales y Métodos.

En primer lugar se analizaron las interacciones de esta proteína de fusión, VC-Bak, con las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa por citometría de flujo. Si se comparan los resultados mostrados en la Figura 4.57 y los correspondientes de las Figuras 4.40, 4.46 y 4.52, las interacciones establecidas entre las proteínas “sólo-BH3” estudiadas y Bak son muy similares en porcentaje e intensidad de fluorescencia. Se observa una disminución de estas interacciones al deletar el dominio BH3 de Bim, PUMA y Noxa, especialmente en los ratios de intensidades de fluorescencia. Es importante el hecho de que no se detectan cambios especialmente relevantes en las interacciones cuando se emplean las proteínas de fusión Bak-VC y VC-Bak. Este dato estaría indicando que las interacciones que detectamos son específicas, y que la fusión del fragmento de la proteína Venus en uno u otro extremo de Bak no altera la adquisición de una conformación adecuada para establecer dichas interacciones.



**Figura 4.57** Análisis por citometría de flujo de las interacciones entre la proteína de fusión VC-Bak y las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y los respectivos mutantes. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

A continuación, se visualizaron por microscopía confocal los complejos fluorescentes formados (Figura 4.58). Se puede observar que la fluorescencia obtenida para las tres parejas tiene una distribución punteada en las células. Esta observación indicaría que la interacción entre estas proteínas ocurre probablemente en las mitocondrias, como se observa en la imagen superpuesta con el marcaje con MitoTracker Red. Cabe destacar que en este caso Bak dispone de un dominio C-terminal libre través del cual puede integrarse en la membrana mitocondrial externa, adquiriendo la localización subcelular correcta.

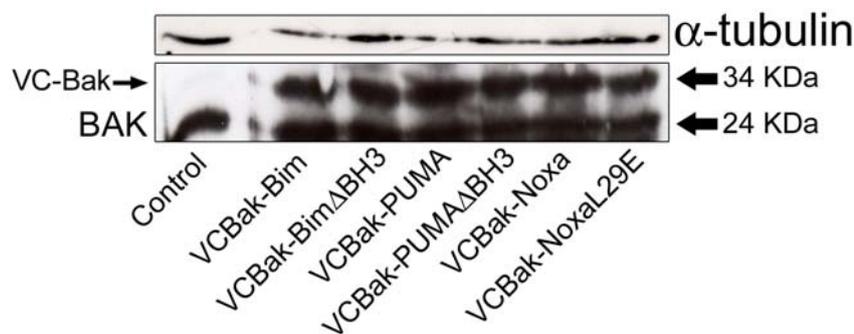


**Figura 4.58** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los complejos formados por la proteína VC-Bak con Bim, PUMA y Noxa. Escala, 50µm.

Cabe destacar que los complejos estudiados anteriormente entre la proteína de fusión inicial de Bak (Bak-VC) y las tres proteínas solo-BH3 también presentaban una distribución que sugería localización mitocondrial (ver Figuras 4.42, 4.49 y 4.54). Resulta interesante que a pesar de tener el extremo C-terminal ocupado por el

fragmento VC, Bak sea capaz de unirse o al menos localizarse en dichos orgánulos. Es probable que en estos casos los complejos de Bak con las proteínas “sólo-BH3” transfectadas se localicen en los descritos “clusters perimitocondriales” (Nechushtan et al. 2001), debido a la ausencia de un dominio C-terminal a través del que insertarse en la membrana de estos orgánulos. Tampoco se puede descartar que la presencia del fragmento VC de la proteína Venus no afecte a su importación y localización en las mitocondrias. No obstante, es destacable el hecho de que no se observa una alteración de la localización subcelular de Bak al formar los complejos con las proteínas “sólo-BH3” independientemente de la posición de la proteína de fusión.

Como en el resto de casos, se analizaron los niveles de expresión de esta nueva proteína de fusión, al transfectarla con las distintas parejas. Se puede observar en la Figura 4.59 que los niveles de expresión alcanzados son muy similares con las distintas combinaciones de vectores, tanto de proteínas silvestres como mutantes. Además, el nivel de expresión de la proteína de fusión es muy similar al de la proteína Bak endógena en estas condiciones.



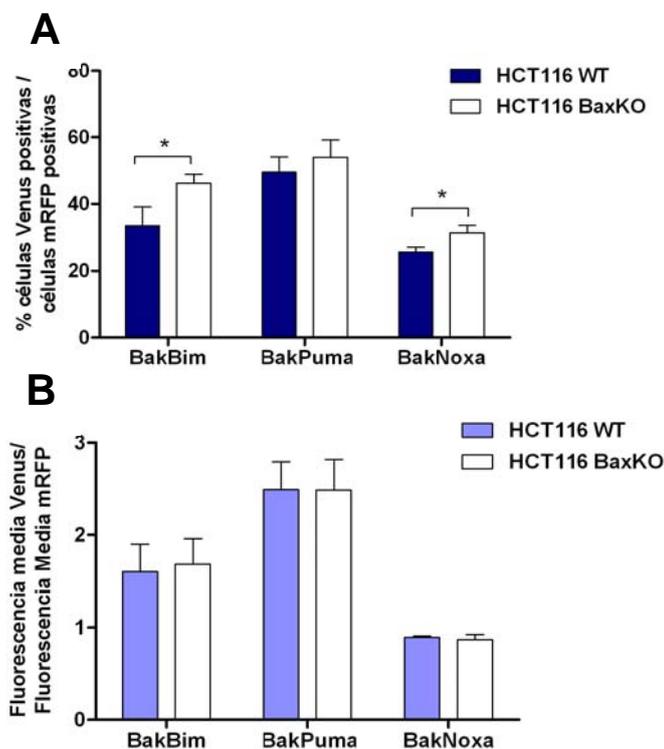
**Figura 4.59 Análisis por western-blot de la proteína de fusión VC-Bak en combinación con las proteínas “sólo-BH3” silvestres y mutantes.** El peso molecular de la proteína de fusión corresponde a la suma del peso de la proteína endógena y el peso del fragmento correspondiente de la proteína fluorescente Venus (VC ~ 10,5 KDa).

#### 4.3.5 Comprobación de las interacciones entre proteínas “sólo-BH3” y Bak/Bax en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO.

Se planteó la posibilidad de que la presencia de proteínas proapoptóticas multidominio Bak/Bax endógenas podía influir en las interacciones detectadas mediante la técnica BiFC. Por ello se decidió estudiar las interacciones con las

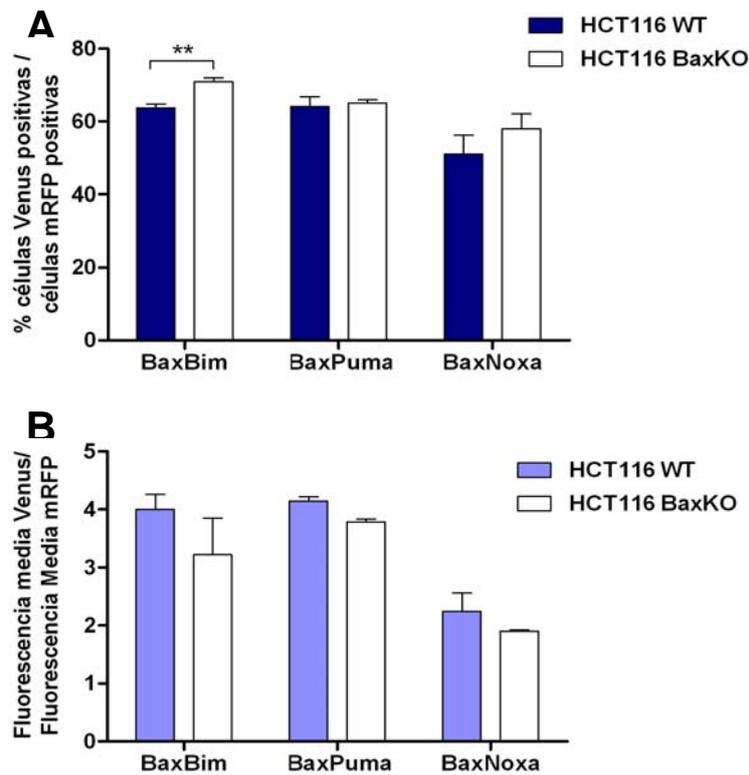
proteínas “sólo-BH3” en células de carcinoma de colon HCT116 y en la sublínea carente de Bax. Cabe destacar que estas células se transfectaron de manera eficiente siguiendo el mismo protocolo que para la línea celular HeLa.

En la Figura 4.60 A se puede apreciar un ligero aumento en la sublínea HCT116 BaxKO del porcentaje de células que presentan complejos fluorescentes por la interacción de Bim, PUMA y Noxa con Bak. No obstante, la intensidad media relativa de estos complejos no varía respecto a la línea parental HCT116. Los resultados obtenidos siguen de forma general la misma tendencia que la observada con la línea HeLa (ver gráficas de Figuras 4.40, 4.46 y 4.52).



**Figura 4.60** Análisis de las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con la proteína proapoptótica Bak mediante BiFC acoplado a citometría de flujo en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO. Los resultados son media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

En cuanto a las interacciones con Bax se puede observar el mismo efecto. Hay un pequeño aumento en los porcentajes de células que presentan señal de BiFC (Figura 4.61 A) cuando las células carecen de Bax. Pero al analizar las intensidades relativas de fluorescencia se detecta incluso una ligera disminución en la línea celular HCT116 BaxKO (Figura 4.61 B).



**Figura 4.61** Análisis de las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con la proteína proapoptótica Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO. Los resultados son media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

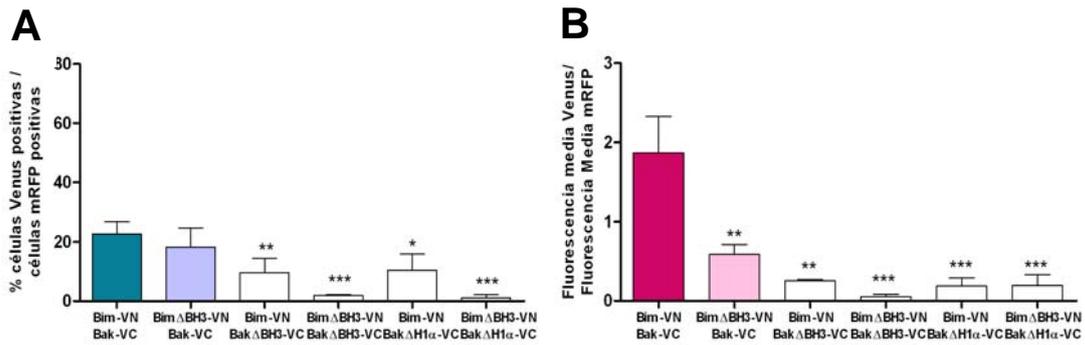
No podemos descartar que la presencia de Bak endógena pueda estar interfiriendo en las interacciones, de manera que los resultados se deberían comprobar en células que no tengan Bak ni Bax. Ante la imposibilidad de disponer de manera inmediata de la línea HCT116 Bak/Bax DKO, se intentó realizar los experimentos en MEF Bak/Bax DKO. No obstante, la baja eficiencia de transfección de dichas células no permitió obtener ningún resultado concluyente.

#### 4.3.6 Implicación del dominio BH3 y de la hélice $\alpha$ 1 de Bak y Bax en su unión a proteínas “sólo-BH3”.

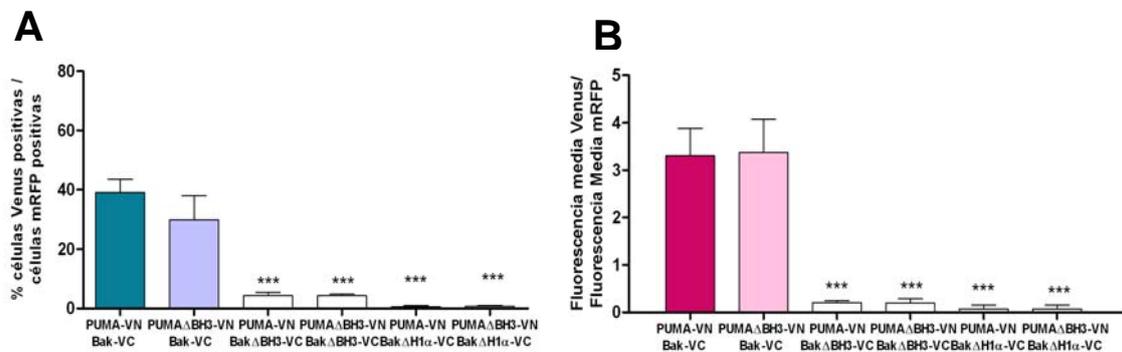
Una vez analizadas las interacciones de Bak y Bax con Bim, PUMA y Noxa, se decidió aplicar la técnica BiFC para intentar determinar la implicación de diferentes dominios de las primeras en dichas interacciones. A pesar de la alta homología de secuencia de Bak y Bax, estas proteínas presentan diferencias importantes en sus mecanismos de acción. Es posible que las proteínas “sólo-BH3” interaccionen de

manera distinta con Bak y con Bax, por lo que se estudió la formación de complejos fluorescentes por BiFC de las tres proteínas “sólo-BH3” con los mutantes de delección del dominio BH3 y de la primera hélice  $\alpha$  de Bak y de Bax. Para la realización de estos experimentos se llevaron a cabo diferentes transfecciones de células HeLa con las combinaciones pertinentes de los vectores mostrados en las Figuras 3.2 y 3.3. Como se ha descrito anteriormente, las células se trataron con zVAD-fmk antes de ser transfectadas y se emplearon 1,5  $\mu$ g de cada vector por cada  $10^6$  células en cultivo. Se analizó la formación de los diferentes complejos mediante citometría de flujo, y la expresión de los mutantes de delección se comprobó mediante western-blot (Figura 4.4, 4.5 y 4.6).

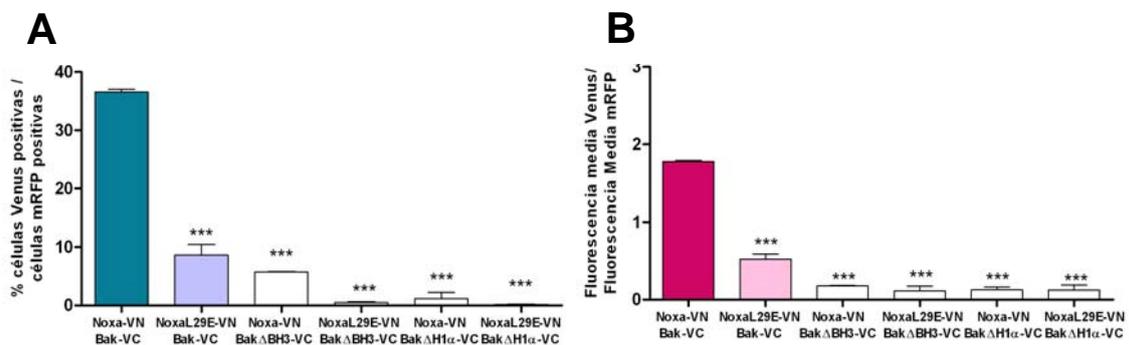
Las Figuras 4.62, 4.63 y 4.64 muestran los datos obtenidos para las diferentes combinaciones de proteínas de fusión silvestres y mutantes de Bak con Bim, PUMA y Noxa, respectivamente. Los resultados obtenidos son equivalentes para las tres proteínas “sólo-BH3”. Se puede observar que la delección del dominio BH3 de Bak hace disminuir significativamente el porcentaje de células que presentan complejos con las proteínas “sólo-BH3” (gráfica A de las tres figuras) así como la intensidad de estos complejos (gráfica B). Esta disminución es mayor cuando Bim y PUMA carecen también de su dominio BH3 o Noxa presenta la mutación L29E dentro de este dominio. Estos datos probablemente indican la implicación del dominio BH3 de estas proteínas “sólo-BH3” en su interacción con el bolsillo hidrofóbico de Bak, del que forma parte su dominio BH3 (Dai et al. 2011). Por otra parte, resulta interesante el hecho de que la delección de la primera hélice de Bak tiene un efecto similar a la del dominio BH3. Este mutante de Bak se expresó de forma correcta en la células, como se muestra en la Figura 4.5, por lo que descartamos que la disminución de complejos fluorescentes deba a una menor presencia de dicha proteína de fusión. Para la detección por western-blot de este mutante se empleó el anticuerpo denominado sc-832 en la Tabla 3.8. Este anticuerpo reconoce un epítipo interno de Bak, permitiendo así la identificación de la proteína de fusión que carece de la primera hélice  $\alpha$ . La implicación de esta primera hélice  $\alpha$  de Bak en la unión de proteínas activadoras estaría en desacuerdo con algunos trabajos en los que se ha descrito que la mutación en el residuo R36 de Bak, que corresponde a un aminoácido crítico en dicha interacción en Bax, no modifica su unión a proteínas “sólo-BH3” (Dai et al. 2011).



**Figura 4.62** Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bak en su interacción con la proteína “sólo-BH3” Bim mediante BiFC acoplado a citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

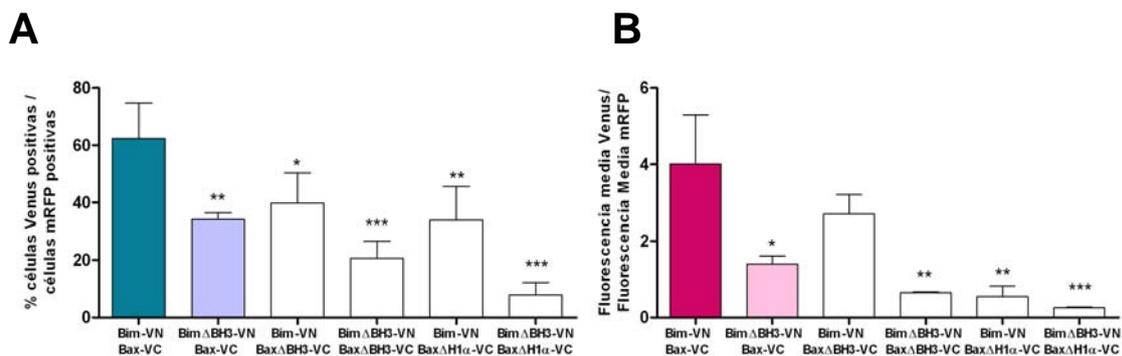


**Figura 4.63** Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bak en su interacción con la proteína “sólo-BH3” PUMA mediante BiFC acoplado a citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

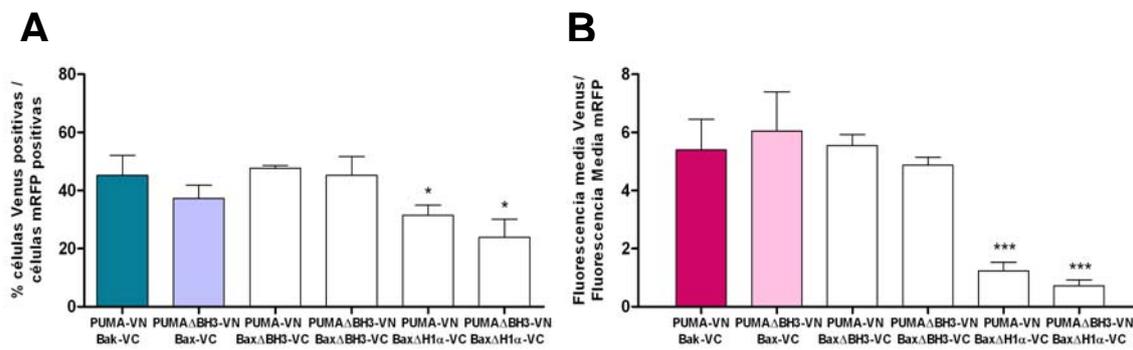


**Figura 4.64** Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bak en su interacción con la proteína “sólo-BH3” Noxa mediante BiFC acoplado a citometría de flujo. Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

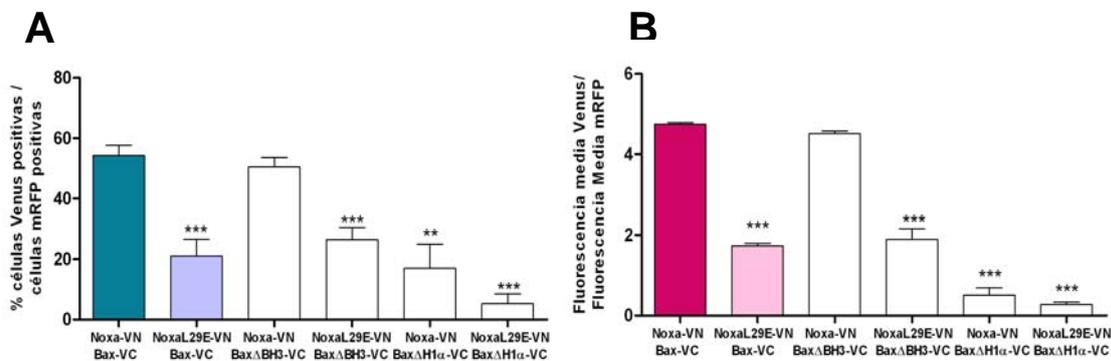
En cuanto a Bax se puede observar en las gráficas de las Figuras 4.65, 4.66 y 4.67 que el dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de esta proteína tienen diferente implicación en su interacción con los potenciales activadores directos “sólo-BH3”. La delección del dominio BH3 de Bax no disminuye la formación de complejos fluorescentes con las proteínas PUMA y Noxa, ni en porcentaje de células (gráficas A de cada figura) ni en intensidades de fluorescencia (gráficas B de cada figura). En el caso de Bim se ve una reducción parcial de la interacción con el mutante Bax $\Delta$ BH3, que solamente es significativa en los datos de porcentaje de células que presentan complejos. Se observa una disminución estadísticamente significativa cuando se estudian las interacciones de Bax $\Delta$ BH3 con los mutantes Bim $\Delta$ BH3 y NoxaL29E. Sin embargo, esta reducción parece ser debida a los mutantes de las proteínas “sólo-BH3”, ya que los datos son equivalentes a los obtenidos con estos mutantes y la proteína de fusión Bax completa. Respecto a PUMA, la delección del dominio BH3 de PUMA y/o de Bax no rompe las interacciones entre estas proteínas, sugiriendo la participación de otras regiones de las proteínas. Nuestros resultados indican, por lo tanto, que el dominio BH3 de Bax no parece estar directamente involucrado en las interacciones con las proteínas “sólo-BH3” activadoras. Estos datos están de acuerdo con la observación de que la mutación K64A dentro del dominio BH3 de Bax rompe su interacción con Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> mientras que no afecta a su asociación con Bid, indicando que este dominio no está implicado en la interacción con proteínas “sólo-BH3” (Cartron et al. 2004a).



**Figura 4.65 Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bax en su interacción con la proteína “sólo-BH3” Bim mediante BiFC acoplado a citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.



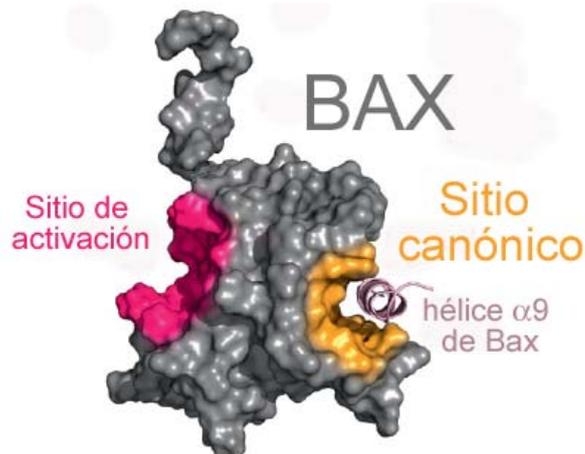
**Figura 4.66 Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bax en su interacción con la proteína “sólo-BH3” PUMA mediante BiFC acoplado a citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.



**Figura 4.67 Análisis del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bax en su interacción con la proteína “sólo-BH3” Noxa mediante BiFC acoplado a citometría de flujo.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Como se ha descrito anteriormente, muchas proteínas implicadas en procesos de señalización celular están reguladas alostéricamente, a través de una zona distinta de su sitio activo (Bu and Callaway 2011). Algunos autores han determinado mediante estudios de RMN que la proteína “sólo-BH3” Bim se une a Bax en el surco hidrofóbico formado por sus hélices  $\alpha$  1 y 6 para causar su activación (Gavathiotis et al. 2008) (La Figura 4.66 muestra un modelo de la estructura de Bax en el que se puede observar dicha zona de unión de proteínas “sólo-BH3”). Anteriormente, se había descrito mediante la técnica de doble híbrido en bacterias que esta primera hélice  $\alpha$  de Bax era esencial para la unión de proteínas activadoras como Bid y PUMA (Cartron et al. 2004a). En relación a la regulación alostérica de Bax, se ha demostrado que la unión de una proteína activadora a Bax causa una serie de cambios en el resto de su

estructura, tanto en el dominio BH3 como en el extremo C-terminal que lleva a su activación (Gavathiotis et al. 2010). Más recientemente se determinó que esta regulación está mediada por una transferencia de carga desde la zona de activación hacia las regiones funcionales de Bax, sin alterar la estructura de su bolsillo hidrofóbico, necesario para la función proapoptótica (Ionescu et al. 2012).



**Figura 4.64 Modelo de la estructura de Bax.** Mediante estudios de RMN llevados a cabo por el grupo de Walensky y colaboradores, se ha determinado que los péptidos correspondientes al dominio BH3 de proteínas como Bim se unen al surco formado por las hélices  $\alpha$  1 y 6 de Bax en la cara N-terminal de esta proteína. Se muestra dicho sitio de activación en rosa. La hélice 9 C-terminal de Bax se encuentra ocupando el bolsillo de unión a BH3 canónico en la forma monomérica inactiva de Bax, por lo que este sitio es inaccesible para las proteínas “sólo-BH3” activadoras. La figura se ha modificado de (Walensky and Gavathiotis 2011).

Cuando se analizaron las interacciones de Bim, PUMA y Noxa con el mutante de Bax carente de la primera hélice  $\alpha$  se pudo observar una reducción significativa de dichas interacciones. Se detectó una disminución del porcentaje de células que presentan complejos fluorescentes (Figuras 4.65, 4.66 y 4.67 A) y más significativa de la intensidad relativa de estos complejos (Figuras 4.65, 4.66 y 4.67 B). Además, la delección o modificación del dominio BH3 de las proteínas Bim, PUMA o Noxa en combinación con este mutante de Bax hacía desaparecer casi completamente la señal fluorescente. Nuestros datos apoyan la participación de esta primera hélice de Bax en su interacción con las proteínas “sólo-BH3”. Algunos autores han descrito que la mutación D33A, dentro de esta hélice de Bax, es capaz de romper la interacción con PUMA (Gallenne et al. 2009). Además, la mutación R84G en Bid hace romper su interacción con Bax, sugiriendo la implicación de un residuo ácido de Bax en dicha

interacción. Cartron y colaboradores, determinaron que el ácido aspártico 33 participaba directamente en la interacción con Bid (Cartron et al. 2004a).

#### **4.3.7 Discusión sobre el papel de las proteínas “sólo-BH3” en la activación de Bak/Bax.**

Se han estudiado las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa y las proteínas efectoras Bak y Bax mediante la técnica BiFC. Se han empleado las proteínas completas así como diferentes mutantes de delección o modificación del dominio BH3 o de delección de la primera hélice  $\alpha$ . Estos mutantes han permitido evaluar la especificidad de las interacciones detectadas, así como analizar la participación de diferentes dominios en dichas interacciones.

Según los resultados obtenidos las proteínas “sólo-BH3” parecen estar actuando a dos niveles. En primer lugar, las proteínas “sólo-BH3” serían capaces de unirse de manera efectiva a proteínas antiapoptóticas, como se ha observado en los experimentos del apartado 4.2. De esta manera liberarían a aquellas moléculas de Bak y Bax que pudieran estar neutralizadas por proteínas antiapoptóticas, las cuales podrían activarse y continuar con la ruta apoptótica. Estos resultados apoyarían la existencia de un modelo indirecto de activación de Bak y Bax (Leu et al. 2004; Willis et al. 2005; Willis et al. 2007). Se ha sugerido también que Bcl-2 es capaz de unirse a las proteínas multidominio Bak y Bax incluso cuando ya han adquirido su conformación activa (Ruffolo and Shore 2003). Por lo tanto, es posible que las proteínas “sólo-BH3” también participen en la neutralización de las proteínas antiapoptóticas una vez Bak y Bax se encuentren activas, impidiendo que éstas sean secuestradas de nuevo y garantizando así la continuidad de la ruta apoptótica.

Por otra parte, también se ha sugerido que determinadas proteínas “sólo-BH3” sean capaces de activar a Bak y Bax por unión directa a ellas. Nuestros resultados apoyan la existencia de interacciones entre proteínas “sólo-BH3” y estas moléculas efectoras. Además de la proteína tBid, cuyo papel como activador directo ha sido propuesto en diferentes trabajos (Desagher et al. 1999; Wei et al. 2000; Lovell et al. 2008; Terrones et al. 2008), se ha confirmado la unión de Bim, PUMA y Noxa a Bak y Bax. Estos datos coinciden con numerosos trabajos publicados en los últimos años (Marani et al. 2002; Cartron et al. 2004a; Kuwana et al. 2005; Certo et al. 2006; Kim et al. 2006; Gavathiotis et al. 2008; Czabotar et al. 2009; Gallenne et al. 2009; Kim et al. 2009; Letai 2009; Merino et al. 2009; Du et al. 2010; Ren et al. 2010; Dai et al. 2011).

Es importante destacar que los datos existentes hasta el momento en los que se ha observado una interacción directa entre proteínas “sólo-BH3” y Bak y/o Bax están basados en péptidos derivados de los dominios BH3 o proteínas recombinantes en liposomas o mitocondrias aisladas. Nuestros resultados muestran las interacciones mencionadas empleando las proteínas completas y en células de mamífero vivas. Los resultados obtenidos en éste y otros estudios parecen indicar que, así como hay proteínas que se unen de manera débil y otras de manera mucho más fuerte a las proteínas antiapoptóticas, también existen activadores directos más o menos fuertes. Sin embargo, no parece estar claro qué es lo que determina la potencia de un activador directo. Aunque Walensky y colaboradores han sugerido que el aumento en el nivel de helicidad de los péptidos BH3 hace aumentar también su capacidad de activación (Walensky et al. 2006), datos de dicroísmo circular presentados posteriormente han descartado esta posibilidad (Du et al. 2010).

En conjunto, nuestros resultados apoyan la existencia de un modelo de activación mixto, que puede compartir rasgos tanto del indirecto como del directo (Ott et al. 2009). Diversos trabajos publicados recientemente plantean la posibilidad de que la activación de Bak y Bax ocurra a través de una compleja red de interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 (Brunelle and Letai 2009; Dewson and Kluck 2009; Llambi et al. 2011). Posiblemente la prevalencia de uno u otro tipo de interacciones dependa del estímulo apoptótico recibido y de la expresión relativa de las proteínas de la familia Bcl-2 según el modelo celular (Leber et al. 2007; Leber et al. 2010). Además, se ha descrito que proteínas “sólo-BH3” como Bim o tBid puedan adquirir distintas conformaciones en membrana (Leber et al. 2010; Shamas-Din et al. 2011). Estas conformaciones determinarán si las proteínas “sólo-BH3” interaccionan directamente con Bak/Bax para promover su activación y posterior MOMP o si se unen a los miembros antiapoptóticos sensibilizándolos. Resultan muy interesantes los resultados que se han obtenido con las proteínas de fusión mutantes. La delección del dominio BH3 de Bak hace disminuir significativamente su interacción con las tres proteínas “sólo-BH3” estudiadas. Este dato confirma por una parte, la especificidad de las interacciones detectadas con las proteínas silvestres. Por otra parte, sugiere que este dominio BH3, implicado en la formación del bolsillo hidrofóbico, sería el lugar de unión de proteínas “sólo-BH3” activadoras, de acuerdo con otros trabajos (Dai et al. 2011). En lo que a Bax se refiere, se ha podido observar que la delección del dominio BH3 no modifica sustancialmente la formación de complejos con Bim, PUMA o Noxa. No obstante, sí lo hace la delección de su primera hélice  $\alpha$ , lo cual concuerda con la implicación de esta zona de Bax en la unión de proteínas “sólo-BH3” activadoras

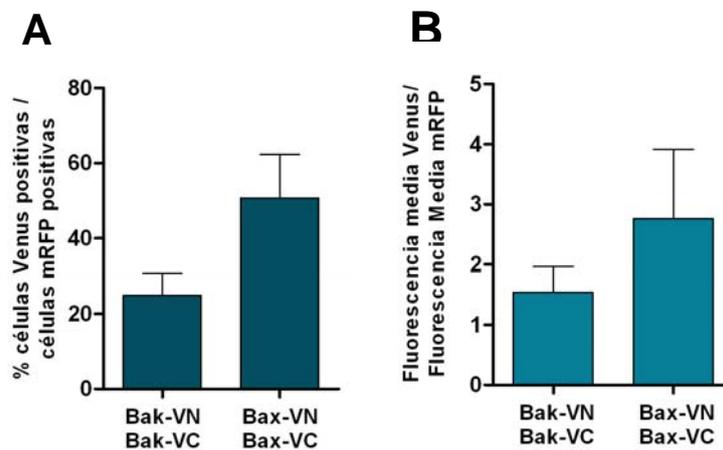
(Cartron et al. 2004a; Gavathiotis et al. 2008; Gallenne et al. 2009). Bax en su estado inactivo tiene la hélice  $\alpha$  9 C-terminal dentro del bolsillo hidrofóbico, estabilizada por un puente de hidrógeno entre la serina 184 y el aspártico 98 (Nechushtan et al. 1999). La ruptura de este puente de hidrógeno, que puede ser inducida por la unión de proteínas “sólo-BH3” activadoras al bolsillo trasero de Bax (Ionescu et al. 2012), causa la liberación de dicha hélice, la activación de Bax y su inserción en las membranas mitocondriales durante la apoptosis (Antignani and Youle 2006).

Los complejos formados por BiFC en nuestros experimentos son esencialmente irreversibles. Esta característica podría parecer incompatible con que las moléculas de Bak/Bax que hayan sido activadas por proteínas “sólo-BH3” puedan proseguir con la ruta apoptótica. Por lo tanto, no sería posible explicar cómo ocurre la permeabilización de las mitocondrias para dar lugar a la salida de citocromo c que observamos en nuestros experimentos. Sin embargo, es posible que haya una activación secundaria de más moléculas de Bak y Bax debido a la interacción entre las moléculas de y descongelación de las líneas celulares. □ PAGEREF\_Toc340566701 \h □□69□□ □ HYPERLINK \l "\_Toc34IN EN.CITE (Tan et al. 2006). Esta activación de más moléculas de Bak/Bax podría ser la que desencadenara la salida de citocromo c. No obstante, tampoco se puede descartar la existencia de interacciones entre una fracción de proteínas “sólo-BH3” transfectadas y moléculas de Bak/Bax endógenas, evento que no se detectaría al no generar señal fluorescente. Este proceso podría activar a dichas proteínas efectoras y permitir el progreso de la cascada de eventos apoptóticos ya que la interacción de proteínas “sólo-BH3” transfectadas con moléculas de Bak/Bax endógenas no formaría un complejo irreversible.

#### **4.4 HOMO Y HETERODIMERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PROAPOPTÓICAS BAK Y BAX.**

Como se ha mencionado anteriormente, las señales apoptóticas que activan la vía intrínseca se traducen en interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 y convergen en Bak y Bax. La activación y posterior oligomerización de éstas, induce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, evento que es considerado como el punto de no retorno que determina el destino de la célula (Gross et al. 1998; Youle and Strasser 2008). Sin embargo, existe cierta controversia en la literatura en cuanto al mecanismo de homo-oligomerización de Bak y Bax.

En este trabajo se decidió abordar el estudio de la dimerización de Bak y Bax mediante la técnica de complementación de fluorescencia, BiFC. Para ello, se generaron los constructos mostrados en la Figura 3.2, de manera que tanto Bak como Bax quedaran fusionadas a los fragmentos VN y VC. Células HeLa se transfectaron con las diferentes parejas, BakVN/BakVC y BaxVN/BaxVC y se analizó la formación de complejos fluorescentes mediante citometría de flujo. Dichas transfecciones se realizaron en presencia de zVAD-fmk en el medio de cultivo y los niveles de expresión alcanzados se valoraron por western-blot (ver Figura 4.3). En la Figura 4.69 A se puede observar que alrededor del 20% de las células transfectadas presentan dímeros de Bak, mientras que los dímeros de Bax están presentes en un 50% de las células transfectadas. Los valores de intensidad media de los dímeros de Bax son de alrededor del doble que los de Bak (Figura 4.69 B).

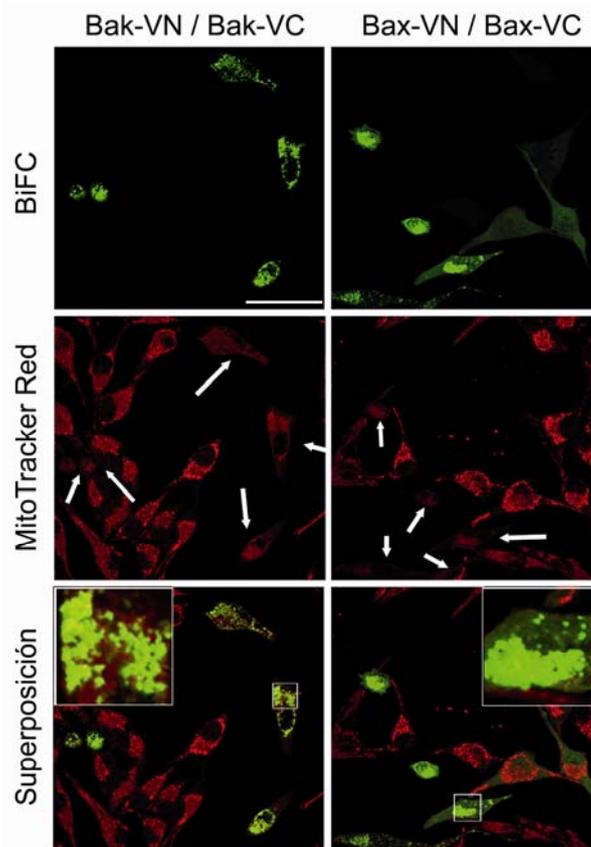


**Figura 4.69 Análisis por citometría de flujo de las homodimerizaciones de Bak y Bax.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

En un trabajo publicado recientemente se emplea la técnica BiFC para visualizar algunos eventos que ocurren durante la apoptosis (Yivgi-Ohana et al. 2011). Estos autores observan una señal fluorescente muy baja cuando transfectan células MCF-7 con los constructos N-YFP-Bax y C-YFP-Bax. La baja complementación observada es debida al hecho de que estas proteínas de fusión conservan la conformación cerrada característica de Bax en el citosol de células no apoptóticas (Goping et al. 1998; Suzuki et al. 2000). Consecuentemente, estos autores detectan un aumento de la señal fluorescente en las mitocondrias tras el tratamiento con etopósido (Yivgi-Ohana et al. 2011). La fusión de los fragmentos de la proteína fluorescente al extremo C-terminal de Bax causa un aumento de la fluorescencia, debido a que Bax se encuentra

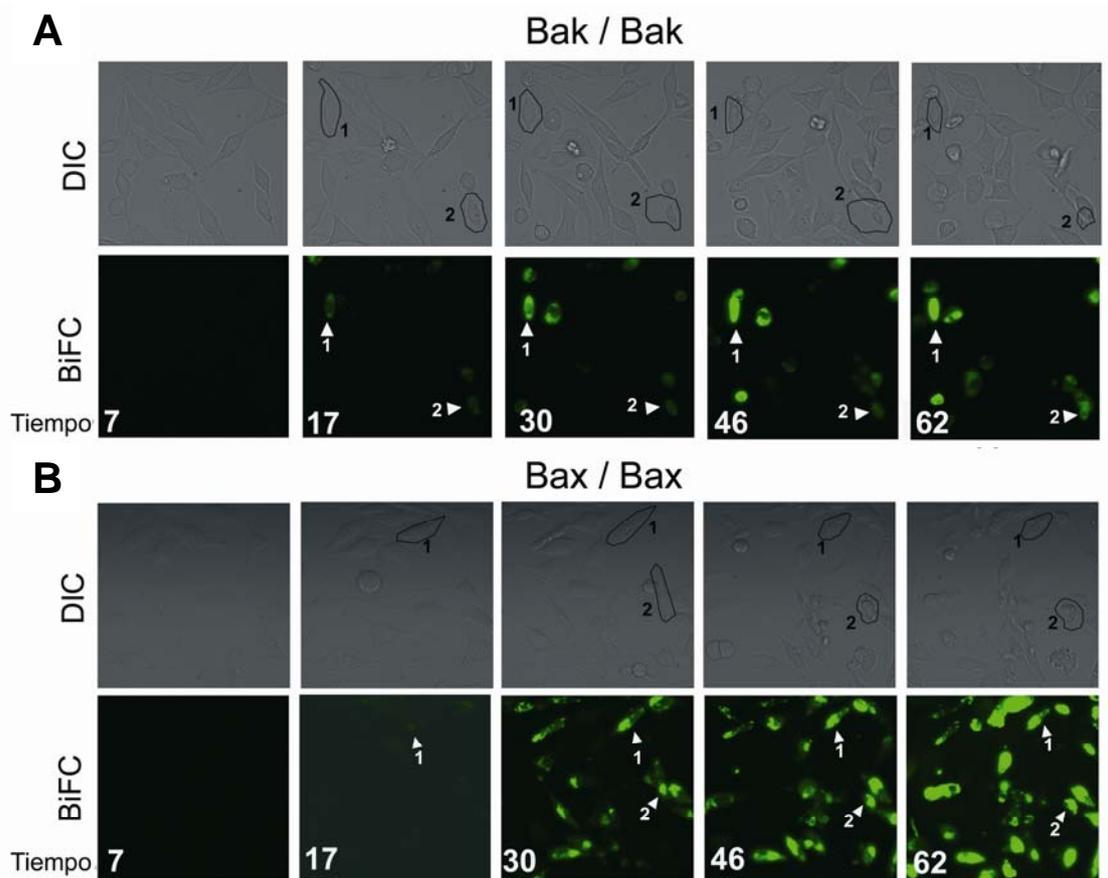
en una conformación constitutivamente activa. Estos resultados concuerdan con la elevada fluorescencia que detectamos en nuestro modelo.

Las fotografías de microscopía confocal mostradas a continuación sugieren que los dímeros de Bak se localizan en las mitocondrias (Figura 4.70). Cuando se observa la ampliación de una sección celular, parece apreciarse que estos complejos fluorescentes forman unas agrupaciones que colocalizan parcialmente con las mitocondrias. Esta observación coincidiría con la existencia de “clusters” o agrupaciones de moléculas de Bak/Bax adyacentes a estos orgánulos que se ha propuesto que se formen durante la apoptosis (Nechushtan et al. 2001). Además, el marcaje difuso de la sonda mitocondrial MitoTracker Red en las células que presentan señal correspondiente a BiFC sugiere la pérdida de potencial mitocondrial. Respecto a los dímeros de Bax se pueden diferenciar dos tipos de distribución subcelular. En las células con morfología sana la señal fluorescente se observa en el citosol. Sin embargo, aquellas células con morfología apoptótica y marcaje mitocondrial atenuado, presentan los complejos probablemente en los “clusters” perimitocondriales mencionados anteriormente (Nechushtan et al. 2001). En otro trabajo se ha determinado la secuencia temporal de translocación de Bax a la mitocondria. En la etapa final de translocación se han observado los mencionados “clusters” formados por muchas moléculas de Bax, que se localizan principalmente pero no exclusivamente en las mitocondrias (Zhou and Chang 2008).



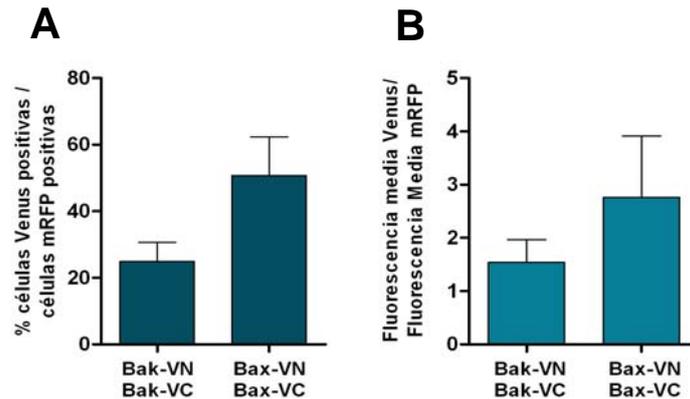
**Figura 4.70 Localización de los complejos Bak-VN/Bak-VC y Bax-VN/Bax-VC.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los homodímeros de Bak y Bax Escala, 50 $\mu$ m.

A continuación se visualizó la formación de los complejos desde el momento de la transfección celular mediante microscopía de time-lapse. En la secuencia de imágenes de la figura 4.71 A se puede apreciar la aparición de fluorescencia correspondiente a los complejos Bak-VN/Bak-VC con un patrón de fluorescencia punteado. A lo largo del tiempo, las células que presentan fluorescencia verde van adquiriendo una morfología característica de la apoptosis. En cuando a las imágenes correspondientes a la dimerización de Bax (Figura 4.71 B) se puede apreciar la aparición de fluorescencia en un porcentaje mayor de células, coincidiendo con los datos de citometría de flujo (Figura 4.69). Además, inicialmente esta fluorescencia tiene una distribución citosólica, que rápidamente cambia hacia un patrón punteado, probablemente indicando la translocación de los complejos hacia las mitocondrias. También se observa la aparición de un fenotipo apoptótico en las células que presentan señal fluorescente.



**Figura 4.71** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las células se transfirieron con las parejas Bak/Bak (**A**) y Bax/Bax (**B**) y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección. (Ver los vídeos correspondientes a esta serie de imágenes: MovBakBak\_DIC; MovBakBak\_BiFC; MovBaxBax\_DIC y MovBaxBax\_BiFC en el DVD adjunto).

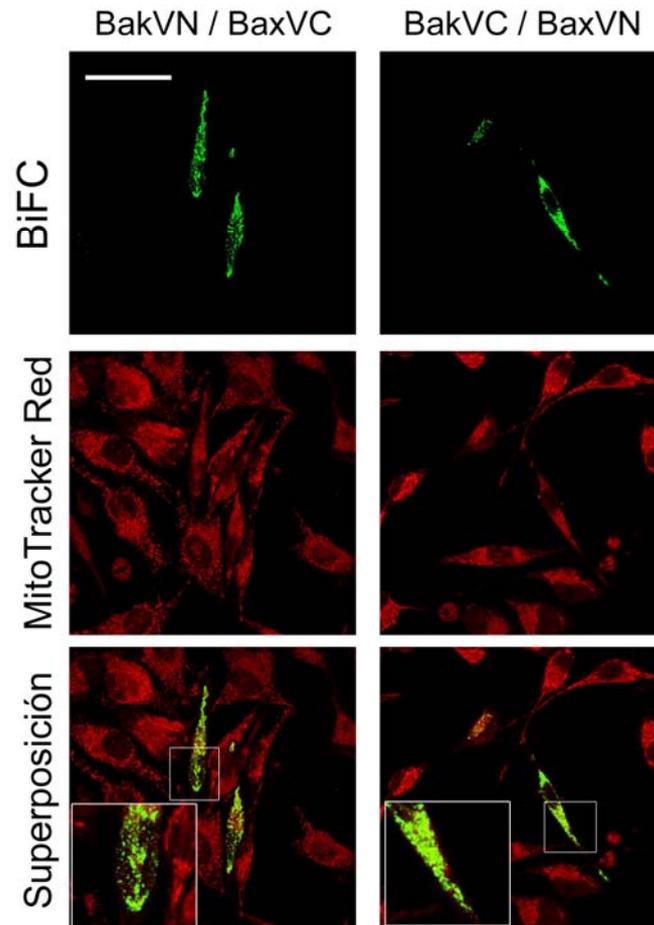
Se ha descrito en la literatura que además de homoligomerizar, Bak y Bax pueden interactuar entre ellos para formar oligómeros (Sundararajan et al. 2001; Dewson et al. 2012). Al evaluar la formación de heterodímeros mediante la técnica BiFC, se detectó que casi el 40% de células HeLa transfectadas presentaban estos complejos (Figura 4.72). La intensidad media de los complejos formados es también relativamente elevada, lo que parece indicar que la formación de estos dímeros se ve favorecida en estas condiciones. Además, cabe destacar que se emplearon las dos combinaciones de vectores disponibles, Bak-VN/Bax-VC y Bak-VC/Bax-VN y los resultados obtenidos fueron equivalentes.



**Figura 4.72 Análisis por citometría de flujo de las heterodimerizaciones de Bak y Bax.** Los resultados son media  $\pm$  SD de siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

La importancia de estos heterodímeros está en entredicho ya que la ruta apoptótica es capaz de proseguir en ausencia de una de estas moléculas (Wei et al. 2001). Zhou y colaboradores demostraron que Bak y Bax se activaban durante la apoptosis y formaban complejos en la membrana mitocondrial externa (Zhou and Chang 2008). No obstante, la colocalización de estas dos proteínas no prueba la formación de heterooligómeros *in vivo*. Estos autores demostraron mediante la técnica FRET que cuando se induce la apoptosis se forman agregados de Bak, de Bax y también de Bak-Bax (Zhou and Chang 2008). Otros autores también han detectado mediante electroforesis nativa la formación de heterodímeros aunque en una fracción minoritaria respecto a los homodímeros (Dewson et al. 2012).

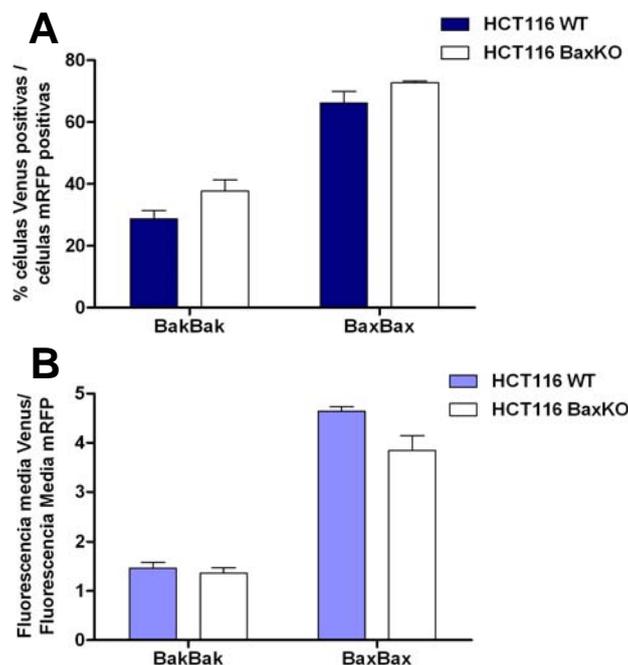
A continuación se visualizó la localización subcelular de los heterodímeros de Bak y Bax (Figura 4.73). Se puede apreciar en las imágenes superpuestas que la señal correspondiente a BiFC colocaliza con la sonda mitocondrial MitoTracker Red, indicando que los dímeros entre estas proteínas se encuentran en las mitocondrias o bien en la zona periférica de estos orgánulos.



**Figura 4.73 Localización de los heterodímeros de Bak y Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos donde se pueden observar los heterodímeros formados entre Bak y Bax. Escala, 50 $\mu$ m.

#### 4.4.1 Comprobación de las homodimerizaciones de Bak y Bax en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO.

Se analizaron las dimerizaciones de Bak y Bax en las líneas celulares de carcinoma de colon HCT116 silvestre o WT y HCT116 BaxKO por la técnica BiFC. Como se observa en las gráficas de la Figura 4.74, el porcentaje de células que presentan señal (gráfica A) y la intensidad media de fluorescencia (gráfica B) de la línea HCT116 silvestre son equivalentes a los obtenidos con la línea HeLa (Figura 4.69). El porcentaje de células con señal fluorescente en la línea derivada que no tiene la proteína Bax es ligeramente superior aunque no es estadísticamente significativo. En el caso de la intensidad media de fluorescencia relativa a la mRFP, los valores obtenidos con la línea HCT116 BaxKO son incluso inferiores en comparación con la línea parental.



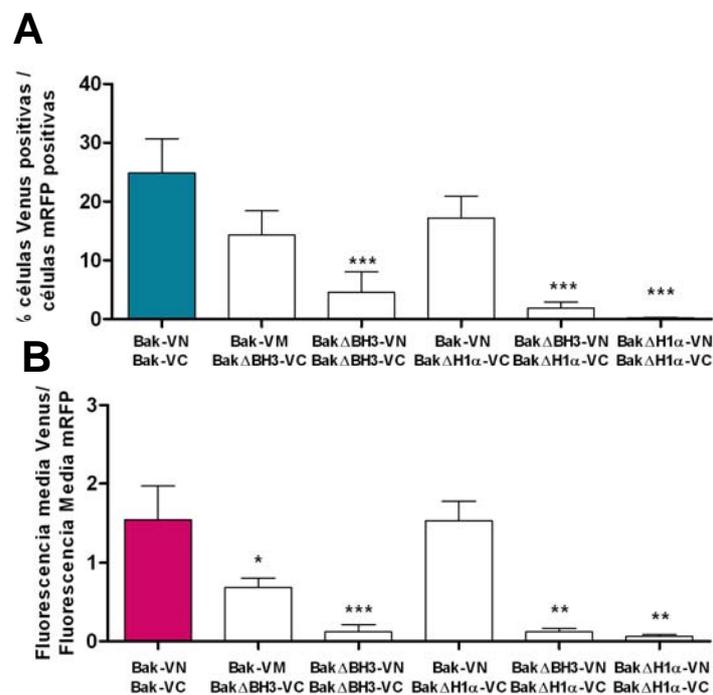
**Figura 4.74 Análisis de las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa con la proteína proapoptótica Bax mediante BiFC acoplado a citometría de flujo en las líneas celulares HCT116 y HCT116 BaxKO.** Los resultados son media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Los datos obtenidos sugieren que las interacciones detectadas no dependen de la línea celular empleada en las condiciones de estos experimentos. Además, como se ha indicado para las parejas de proteínas “sólo-BH3” con Bak/Bax, es posible que la presencia de Bak en la línea HCT116 BaxKO impida ver el efecto de la falta de proteínas efectoras endógenas. Así, sería necesario evaluar estas interacciones en células carentes tanto de Bak como de Bax.

#### 4.4.2 Participación del dominio BH3 y de la hélice $\alpha$ 1 de Bak y Bax en su dimerización.

Una vez analizadas la homodimerización y la heterodimerización de Bak y Bax se decidió estudiar estas interacciones con los mutantes de delección del dominio BH3 y de la primera hélice  $\alpha$  de Bak y Bax. Para llevar a cabo los experimentos se transfectaron las células con las diferentes combinaciones de vectores mostrados en la Figura 3.2. Las células se trataron con zVAD-fmk antes de ser transfectadas y los niveles de expresión de las proteínas de fusión se evaluaron mediante western-blot (Figura 4.5 y 4.6, pág. 112-113).

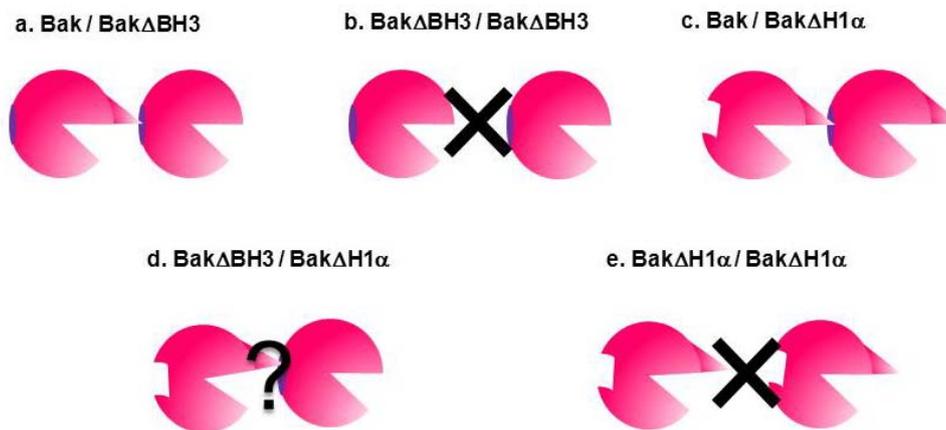
Se puede observar en las gráficas de la Figura 4.75 que la delección del dominio BH3 en una de las proteínas de fusión de Bak reduce parcialmente la fluorescencia observada, tanto a nivel de porcentaje de células como de intensidad de fluorescencia de los complejos formados. Consecuentemente, la delección de dicho dominio en ambas proteínas transfectadas disminuye los complejos significativamente, hasta niveles de interacción despreciables (con una  $p < 0.05$  respecto a la delección del dominio BH3 solamente en una de las moléculas). Curiosamente, la delección de la primera hélice  $\alpha$  de Bak, en combinación con la delección del dominio BH3 o de la hélice  $\alpha$  1 de la otra molécula de Bak, reduce significativamente la formación de complejos fluorescentes ( $p < 0.05$  respecto a la delección del dominio BH3 en una sola molécula). Estos datos sugieren que esta región de Bak también pueda estar directamente implicada en la formación de dímeros.



**Figura 4.75 Análisis mediante BiFC acoplado a citometría de flujo del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bak en la formación de homodímeros.** Los resultados son media  $\pm$  SD de entre tres y siete experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Los datos anteriores parecen indicar que es necesario que esté presente el dominio BH3 en al menos una de las moléculas que forma el dímero de Bak. Este dato estaría de acuerdo con la existencia de un modelo de oligomerización en el que estén implicados tanto el bolsillo hidrofóbico de unión de dominios BH3 (hélices  $\alpha$  3 y 4) como el bolsillo trasero formado por las hélices  $\alpha$  1 y 6 (Gavathiotis et al. 2008; Chipuk et al. 2010; Dai et al. 2011). De esta manera es posible que la interacción entre el

dominio BH3 de una molécula de Bak y el bolsillo trasero de otra forme un dímero asimétrico, generando una cadena de monómeros que se ha denominado “daisy chain” (Kim et al. 2009; Leber et al. 2010) (Ver Figura 4.76 para las diferentes combinaciones de proteínas de fusión). Cabe destacar la ausencia de señal correspondiente a BiFC en la pareja representada en el apartado d de la Figura 4.76. En este caso debería poder detectarse interacción mediante la inserción del dominio BH3 del monómero con la hélice a 1 delecionada en el bolsillo trasero del monómero carente de dominio BH3. Es posible que la deleción del dominio BH3 altere la conformación de la proteína de manera que la región trasera no se encuentre disponible para la interacción con un dominio BH3. Esto explicaría también la disminución que se observa cuando se elimina el dominio BH3 de una de las moléculas de Bak (Figura 4.75, 4.76 a).

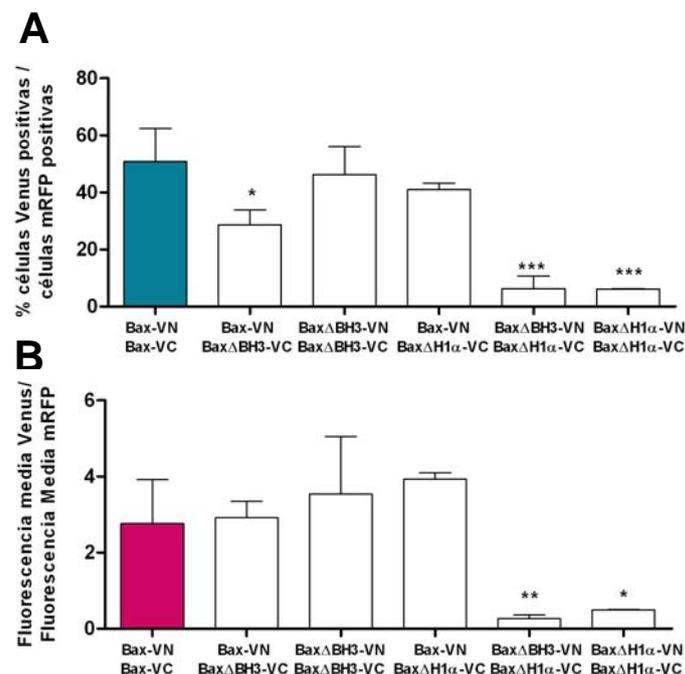


**Figura 4.76 Posibles interacciones entre las diferentes proteínas de fusión empleadas en los ensayos de BiFC para analizar la oligomerización de Bak.** Las moléculas de Bak con un dominio BH3 intacto pueden interaccionar con la parte trasera de otra molécula de Bak **(a-c)**, mientras que cuando las dos proteínas carecen del dominio BH3 la interacción se encuentra impedida **(b)**. La interacción entre un monómero de Bak con la primera hélice delecionada y otro monómero carente del dominio BH3 debería poder ocurrir por inserción del dominio BH3 del primero en el bolsillo trasero del segundo; lo cual no se detecta en nuestros experimentos de BiFC **(d)**. La deleción de la región trasera en ambas moléculas impide la asociación de éstas a pesar de la presencia de los dominios BH3 **(e)**.

El modelo de dimerización asimétrico sería compatible con la formación de un oligómero compuesto de 8 subunidades, octámero, capaz de generar un poro de la membrana mitocondrial de unos 40 Å, adecuado para el paso de moléculas como citocromo c (Saito et al. 2000; Dai et al. 2011; Pang et al. 2012). Las fotografías de microscopía confocal mostradas en la Figura 4.70 sugieren la formación de complejos

entre Bak más allá de simples dímeros, por lo que probablemente las proteínas de fusión que se han transfectado puedan estar formando oligómeros en o cerca de las mitocondrias. Además, este modelo de oligomerización contempla la unión transitoria de moléculas activadoras al bolsillo hidrofóbico de Bak (Dai et al. 2011; Pang et al. 2012), cuya implicación se ha confirmado en resultados previos (ver apartado 4.3).

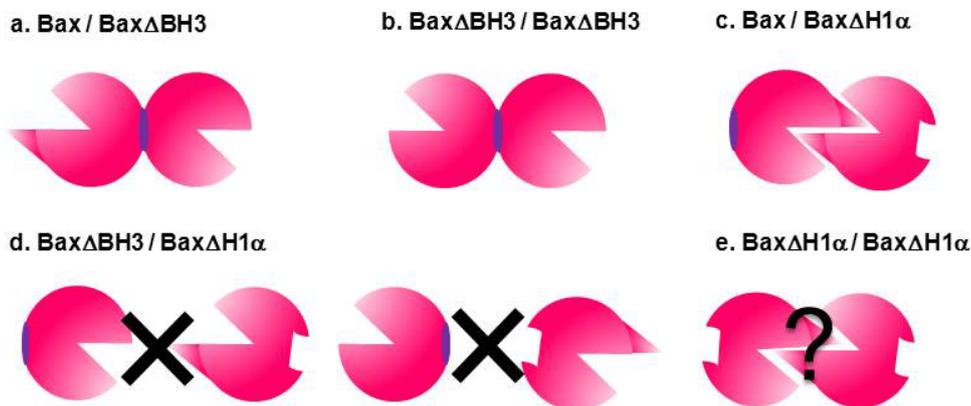
A continuación se estudió la dimerización de los distintos mutantes de Bax. Los datos presentados en la Figura 4.77 muestran que la delección del dominio BH3 o de la primera hélice  $\alpha$  tiene efectos diferentes en la dimerización de esta proteína.



**Figura 4.77 Análisis mediante BiFC acoplado a citometría de flujo del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bax en la formación de homodímeros.** Los resultados son media  $\pm$  SD de entre tres y siete experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

Se puede observar que la delección del dominio BH3 en una e incluso en las dos proteínas de fusión de Bax no impide la formación de complejos entre estas proteínas. Esto podría indicar que el dominio BH3 de Bax no se encuentra involucrado en la formación de dímeros de Bax. Sin embargo, estos resultados podrían explicarse si Bax formara dímeros simétricos por interacción entre los dominios BH3 de dos moléculas y posteriormente dos dímeros adyacentes se unieran a través de la región trasera formada por las hélices  $\alpha$  1 y 6 de dos moléculas de Bax (Figura 4.78 apartados a, b y c). Estos datos también estarían de acuerdo con la observación de que la falta del dominio BH3 en una de las proteínas de fusión y de la hélice  $\alpha$  1 en la otra impide la

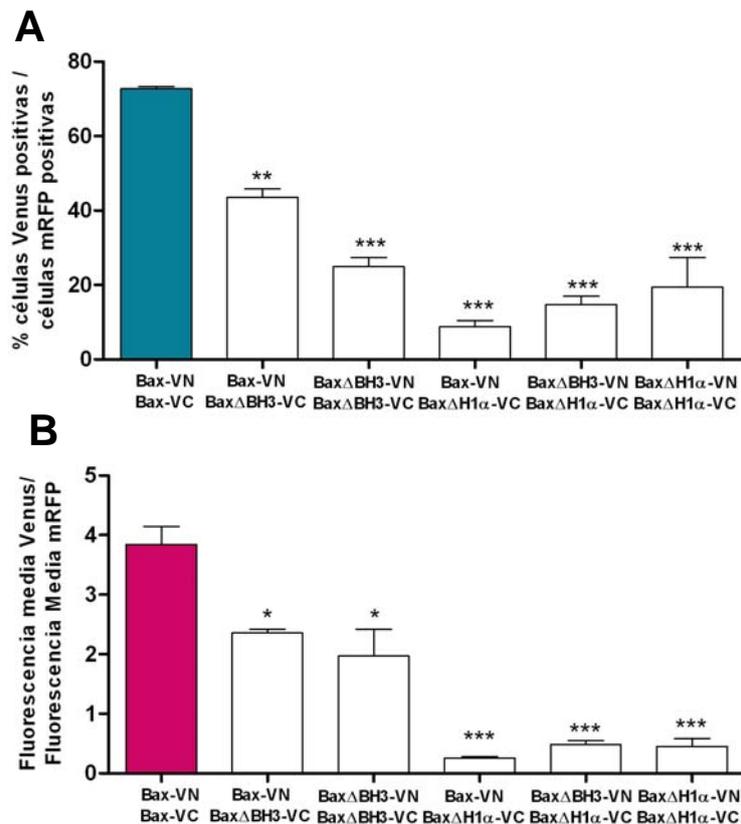
interacción de éstas (Figura 4.78 apartado d;  $p < 0.05$  respecto a la delección del dominio BH3 en una sola molécula). Finalmente los resultados de BiFC no es posible detectar la dimerización de Bax cuando ambas moléculas transfectadas presentan una delección de la primera hélice  $\alpha$ . No obstante, como se aprecia en el apartado e de la Figura 4.78 según el modelo de dimerización simétrico, estas proteínas deberían de poder interactuar mediante sus dominios BH3, lo cual no se detecta en los experimentos mostrados en la Figura 4.77. Estos resultados podrían indicar que en el caso de Bax, la delección de la primera hélice  $\alpha$  1 estaría afectando a la estructura de la proteína, impidiendo la unión de los dominios BH3 en los correspondientes bolsillos hidrofóbicos.



**Figura 4.78 Posibles interacciones entre las diferentes proteínas de fusión empleadas en los ensayos de BiFC para analizar la oligomerización de Bax.** Las moléculas de Bax silvestres o carentes del dominio BH3 pueden interactuar mediante la zona trasera formada por las hélices  $\alpha$  1 y 6 (a-b). Cuando una de las moléculas tiene su hélice  $\alpha$  1 delecionada puede asociarse con una molécula de Bax silvestre mediante interacción entre los dominios BH3 de ambas (c); mientras que si la otra molécula carece del dominio BH3 la interacción se ve impedida (d). La delección de la primera hélice  $\alpha$  en ambas moléculas debería permitir a formación de complejos fluorescentes por asociación de los dominios BH3, resultado que no se detecta en los experimentos de BiFC realizados (e).

Para estudiar la posible influencia de Bax endógeno de la línea células HeLa en la visualización de las dimerizaciones de las distintas proteínas de fusión, se realizaron los mismos experimentos en la línea celular HCT116 BaxKO. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.79. Se puede observar que la delección del dominio BH3 en una o las dos proteínas transfectadas tiene el mismo efecto que en células HeLa, ya que hace disminuir pero no impide la interacción. De nuevo no se detecta interacción

entre las dos proteínas de fusión que carecen de la primera hélice  $\alpha$ . Este dato permite descartar que esté ocurriendo una interacción entre las proteínas transfectadas y las moléculas de Bax endógeno que no lleve a la complementación de los dos fragmentos de la proteína Venus. Por lo tanto, una posible explicación a la ausencia de interacción en esta combinación de proteínas sería que la delección de la hélice  $\alpha$  1 en Bax cause una alteración en su conformación que impida la asociación con otras moléculas que también están modificadas.



**Figura 4.79** Análisis mediante BiFC acoplado a citometría de flujo del papel del dominio BH3 y la hélice  $\alpha$  1 de Bax en la formación de homodímeros en la línea celular HCT116 BaxKO. Los resultados son media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0,001.

La formación de dímeros simétricos entre dos moléculas de Bax y la unión de dímeros mediante la parte trasera de dos moléculas adyacentes estaría de acuerdo con el modelo propuesto por otros autores anteriormente (Bleicken et al. 2010; Westphal et al. 2010; Dewson et al. 2012) (Figura 4.81). Estos autores han determinado que la oligomerización de los dímeros ocurre a través de las hélices  $\alpha$  6, situadas en la región trasera de las moléculas de Bax. En este trabajo se ha empleado un mutante de delección de la primera hélice  $\alpha$ , que junto a la hélice 6 forma el bolsillo

trasero de interacción entre los dímeros. Por lo tanto, suponemos que la mutación que hemos generado causa un efecto equivalente a delecionar la hélice  $\alpha$  6.

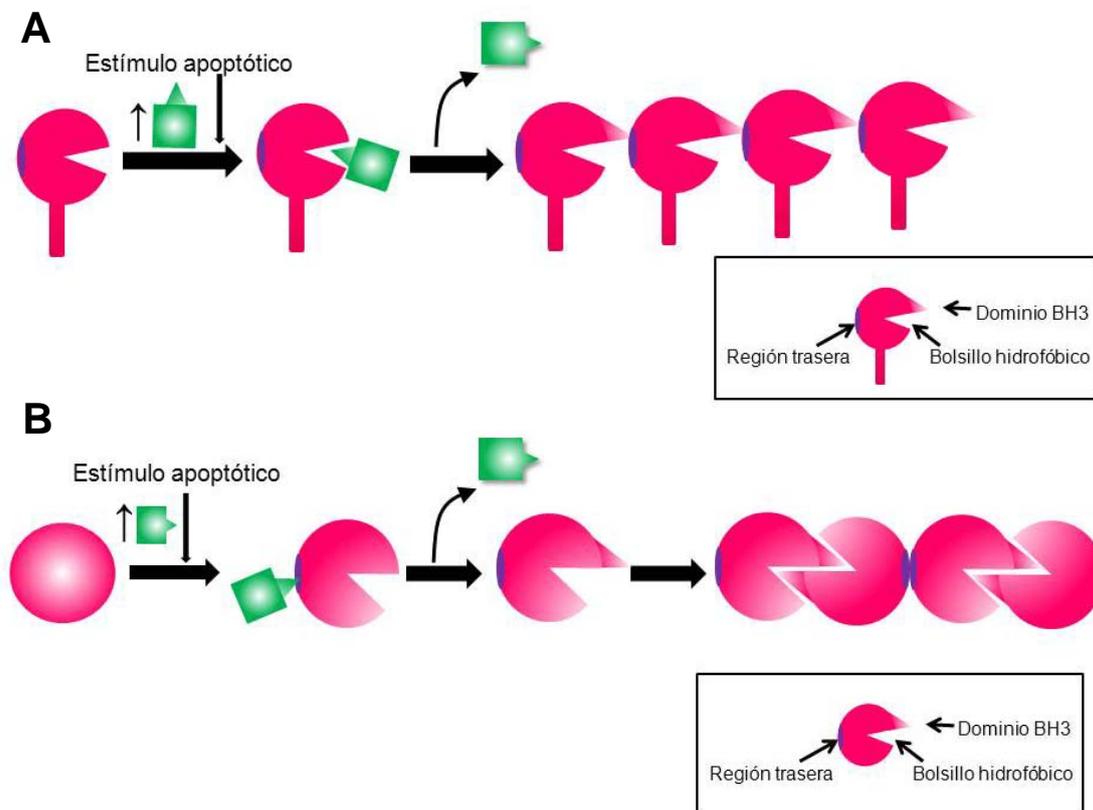
#### **4.4.3 Discusión sobre el mecanismo de dimerización de las proteínas Bak y Bax.**

Se ha estudiado mediante la técnica BiFC la dimerización de Bak y Bax. Estas dos proteínas podrían tener papeles redundantes en la célula ya que la falta de una u otra no ofrece una protección significativa frente a la apoptosis (Lindsten et al. 2000; Wei et al. 2001). No obstante, trabajos más recientes sugieren que estas proteínas puedan tener papeles diferentes en células humanas frente a determinados estímulos apoptóticos. Así, la depleción de Bak o Bax en células HeLa confiere resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino o *Neisseria gonorrhoeae* (Ngo) (Kepp et al. 2007). También se ha observado que glioblastomas multiformes deficientes de Bax o con baja expresión de Bak son refractarios al tratamiento con luz ultravioleta, estaurosporina y doxorubicina (Cartron et al. 2003b). A pesar de presentar una alta homología de secuencia, estas dos proteínas pueden presentar mecanismos de acción distintos, llevados a cabo mediante diferentes procesos de activación y oligomerización.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que Bak dimeriza mediante la inserción de un dominio BH3 en el bolsillo trasero de otra molécula de Bak (Figura 4.80 A). Este tipo de dimerización asimétrica ha sido sugerida por otros autores anteriormente (Gavathiotis et al. 2008; Chipuk et al. 2010; Dai et al. 2011). Esto llevaría a la formación de una cadena de moléculas de Bak que tienen involucradas dos superficies de interacción con las moléculas adyacentes. Sería posible que este mecanismo llevara a la obtención de un octámero, previa salida de la molécula activadora del bolsillo hidrofóbico de Bak (Saito et al. 2000; Dai et al. 2011; Pang et al. 2012). Este modelo implica la activación de una primera molécula de Bak por parte de proteínas "sólo-BH3" activadoras u otro activador no definido. La autoactivación de más moléculas de Bak permitiría la adición de más monómeros al oligómero en crecimiento (Tan et al. 2006). No obstante, también hay estudios que proponen una dimerización simétrica entre moléculas de Bak (Dewson et al. 2008; Dewson et al. 2009b; Oh et al. 2010) con los que nuestros resultados estarían en desacuerdo.

En cuanto a la dimerización de Bax, los resultados obtenidos por BiFC han mostrado que a pesar de la delección del dominio BH3 de Bax, las moléculas

transfectadas continúan interaccionando entre ellas (Figura 4.80 B). Es, por lo tanto, posible que en la línea HeLa las proteínas de fusión que se están transfectando interaccionen con moléculas endógenas de Bax. Esta interacción podría darse por inserción del dominio BH3 de las moléculas endógenas en el bolsillo hidrofóbico de las transfectadas. La unión entre las proteínas transfectadas ocurriría entonces a través de las regiones traseras de ambas moléculas, lo cual concuerda con la disminución de fluorescencia observada al deletar la hélice  $\alpha$  1 de Bax. Este tipo de dimerización simétrica ha sido descrita en otros trabajos previamente (Bleicken et al. 2010; Westphal et al. 2010; Dewson et al. 2012). Los datos obtenidos con las células HCT116 BaxKO apoyan esta idea ya que se observa una disminución de los dímeros Bax/Bax con los mutantes  $\Delta$ BH3, si bien esta disminución no es total (Figura 4.79).



**Figura 4.80 Modelo propuesto para la dimerización de Bak y Bax según los resultados obtenidos en los experimentos de BiFC. (A)** Bak sería activado por la unión transitoria de una proteína “sólo-BH3” a su bolsillo hidrofóbico, exponiendo así su dominio BH3. Este dominio BH3 podría interaccionar con la región trasera de otro monómero de Bak, causando su activación y posterior unión a la siguiente molécula de Bak. **(B)** Bax sería activado por la unión de una proteína “sólo-BH3” a su región trasera. La unión de dos moléculas de Bax activas se daría mediante inserción de los dominios BH3 de cada una en el bolsillo hidrofóbico de la otra molécula. La interacción entre las regiones traseras de dos dímeros adyacentes permitiría la formación de oligómeros asimétricos.

Es importante mencionar que los experimentos de BiFC realizados en este trabajo no permiten llegar a un modelo de oligomerización de Bak y Bax concluyente. Los resultados que se han obtenido han permitido detectar la existencia de dímeros y/o oligómeros de Bak y de Bax y se ha podido caracterizar el efecto de determinadas deleciones en el proceso de formación de complejos. El empleo de mutantes de deleción de otros dominios implicados en las interacciones, así como de mutantes puntuales, ayudaría a dilucidar el papel exacto de las diferentes regiones de estas proteínas en la formación de los dímeros y oligómeros.

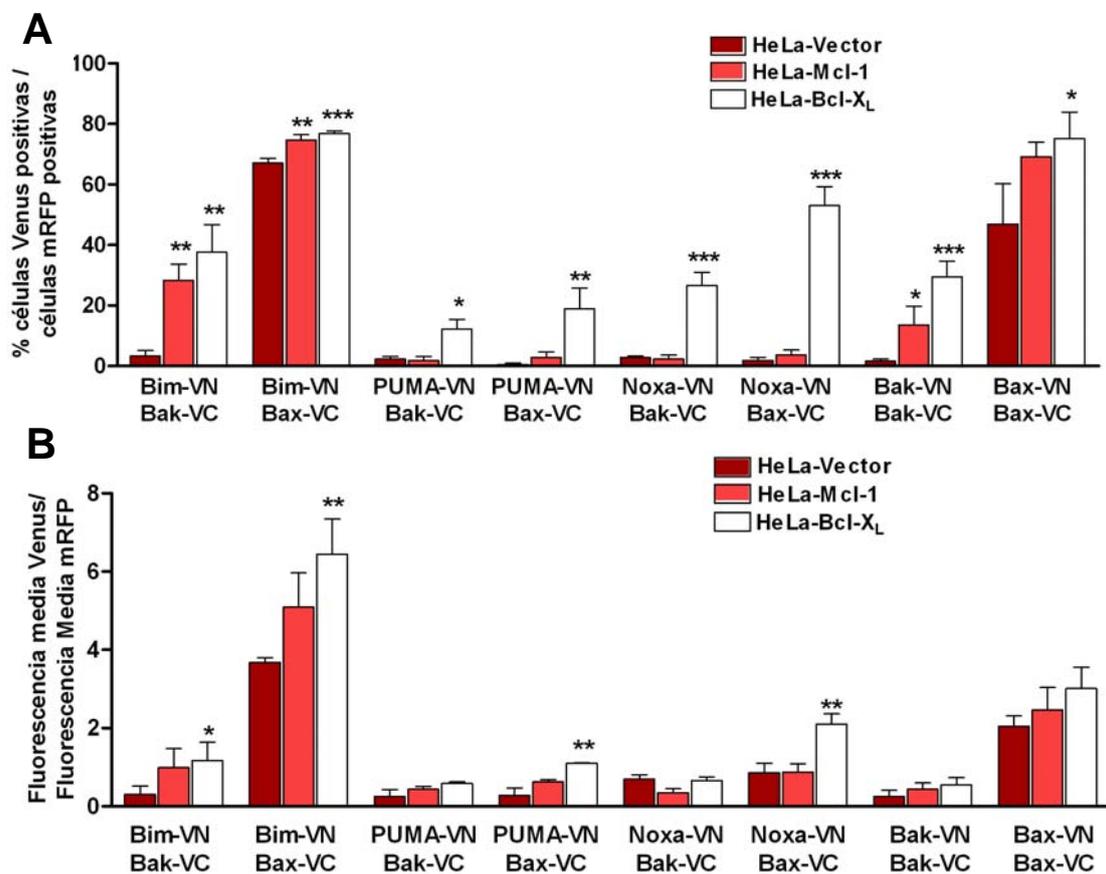
#### **4.5 EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS SOBRE LAS INTERACCIONES DETECTADAS POR BiFC.**

Los resultados obtenidos en el apartado 4.3 parecen indicar que las proteínas sólo-BH3 analizadas son capaces de interactuar directamente con Bax y Bak. Con el fin de analizar si las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> pueden bloquear este proceso se transfectaron las parejas de vectores correspondientes en células HeLa que sobreexpresan dichas proteínas antiapoptóticas de forma estable. En primer lugar se generaron estas líneas celulares derivadas de HeLa mediante infección retroviral, como se describe en el apartado 3.3.3, con los vectores pBabe-Mcl-1 y pBabe-Bcl-X<sub>L</sub>. Se generó una tercera línea con el vector vacío que sirve de línea control. La sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas se verificó mediante western-blot (Figura 4.7) y se verificó la mayor capacidad de protección frente a la muerte inducida por la transfección transitoria de proteínas proapoptóticas (Figura 4.8).

En primer lugar se quiso analizar las interacciones entre proteínas proapoptóticas en ausencia de zVAD-fmk en estas líneas celulares. La transfección con las parejas de proteínas proapoptóticas se llevó a cabo en los experimentos anteriores en presencia de este inhibidor de caspasas. Por ello, se planteó que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas podía favorecer las interacciones sin el pretratamiento de las células con zVAD-fmk. Las diferentes líneas se transfectaron con las combinaciones de vectores correspondientes mostrados en la Figura 3.2. En las gráficas de la Figura 4.81 se puede observar que cuando las células sobreexpresan una proteína antiapoptótica el nivel de interacción detectado es mayor, tanto en porcentaje de células (A) como en intensidad de fluorescencia de los complejos (B). En los casos de

Bim/Bax y Bax/Bax el aumento es menor ya que es posible detectar dichos complejos en la línea control en un porcentaje relativamente elevado de las células transfectadas.

Los aumentos detectados son especialmente importantes en los datos de porcentajes de células que presentan complejos fluorescentes (gráfica A). Para las parejas PUMA/Noxa con Bak/Bax el porcentaje de células en las que se detecta interacción es despreciable tanto en la línea control como en HeLa-Mcl-1. No obstante, se observa un aumento significativo cuando Bcl-X<sub>L</sub> se encuentra sobreexpresada. Probablemente, la mayor expresión de esta proteína confiere cierta resistencia frente a la transfección con proteínas proapoptóticas, permitiendo su interacción en las células y la visualización de los complejos fluorescentes.

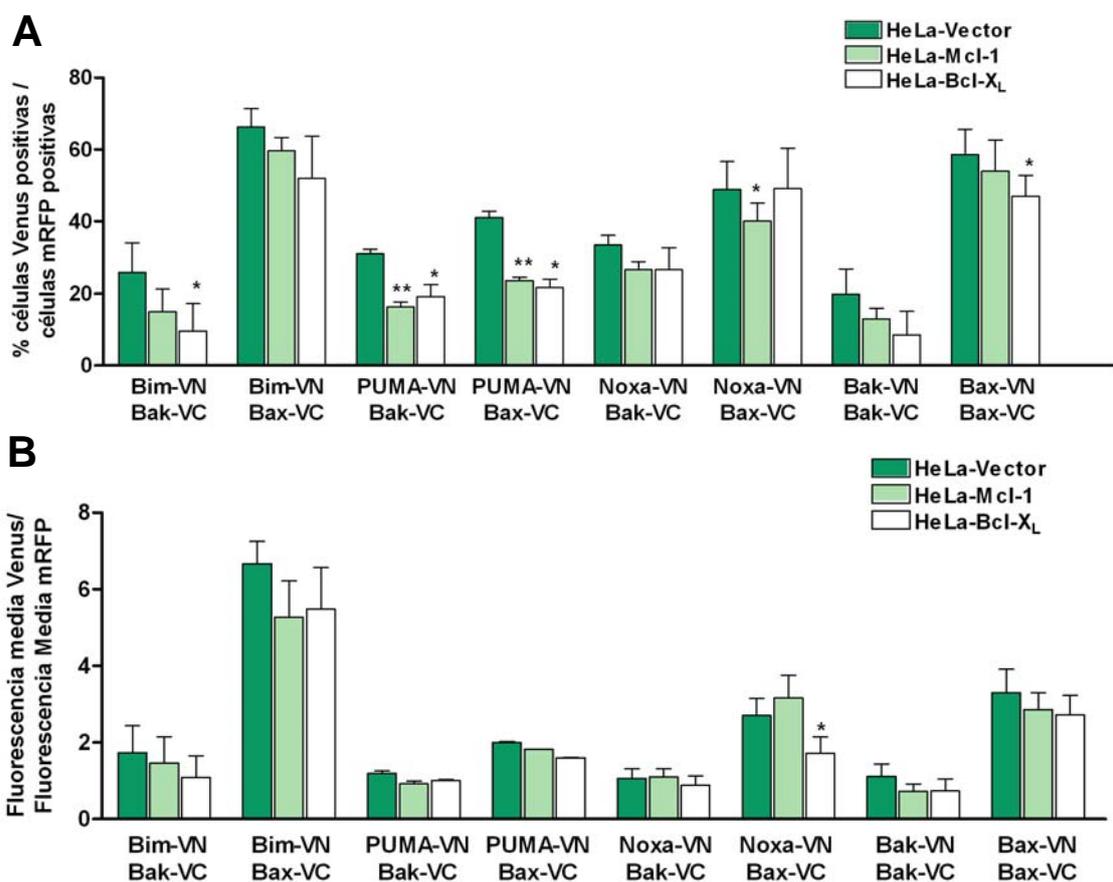


**Figura 4.81** Análisis por citometría de flujo de las interacciones entre distintas parejas de proteínas en ausencia de zVAD en las líneas celulares HeLa-Vector, HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub>. Los resultados son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

A continuación se estudiaron las interacciones entre las proteínas “sólo-BH3” con Bak/Bax y la dimerización de Bak y Bax en las líneas transfectantes en presencia de

zVAD-fmk. Los resultados obtenidos con la línea HeLa-Vector son equivalentes a los obtenidos con la línea parental, por lo que sirve como control para comparar con las líneas derivadas.

Se puede observar que la fluorescencia debida a la complementación de Bim o Noxa con Bak y de PUMA con Bak y Bax se reduce en las líneas derivadas respecto a la línea control. La interacción de la pareja Bim/Bax también se reduce aunque los niveles no son estadísticamente significativos. También se detecta una disminución en las dimerizaciones de Bak y de Bax, especialmente en el porcentaje de células con complejos (Figura 4.82).

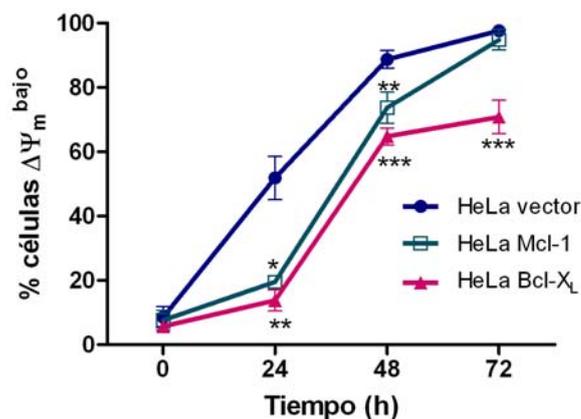


**Figura 4.82** Análisis por citometría de flujo de las interacciones entre distintas parejas de proteínas en presencia de zVAD en las líneas celulares HeLa-Vector, HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub>. Los resultados son media ± SD de tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

En ningún caso la sobreexpresión de Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub> elimina totalmente las interacciones entre proteínas proapoptóticas, sugiriendo que la sobreexpresión de estas proteínas ofrece una protección parcial, retrasando la activación de Bak y Bax.

Es probable que parte de las proteínas proapoptóticas transfectadas interactúen con las antiapoptóticas que se encuentran sobreexpresadas. En este caso, habrá una menor fracción de proteínas de fusión disponibles en la célula que puedan complementarse con otras para generar complejos fluorescentes.

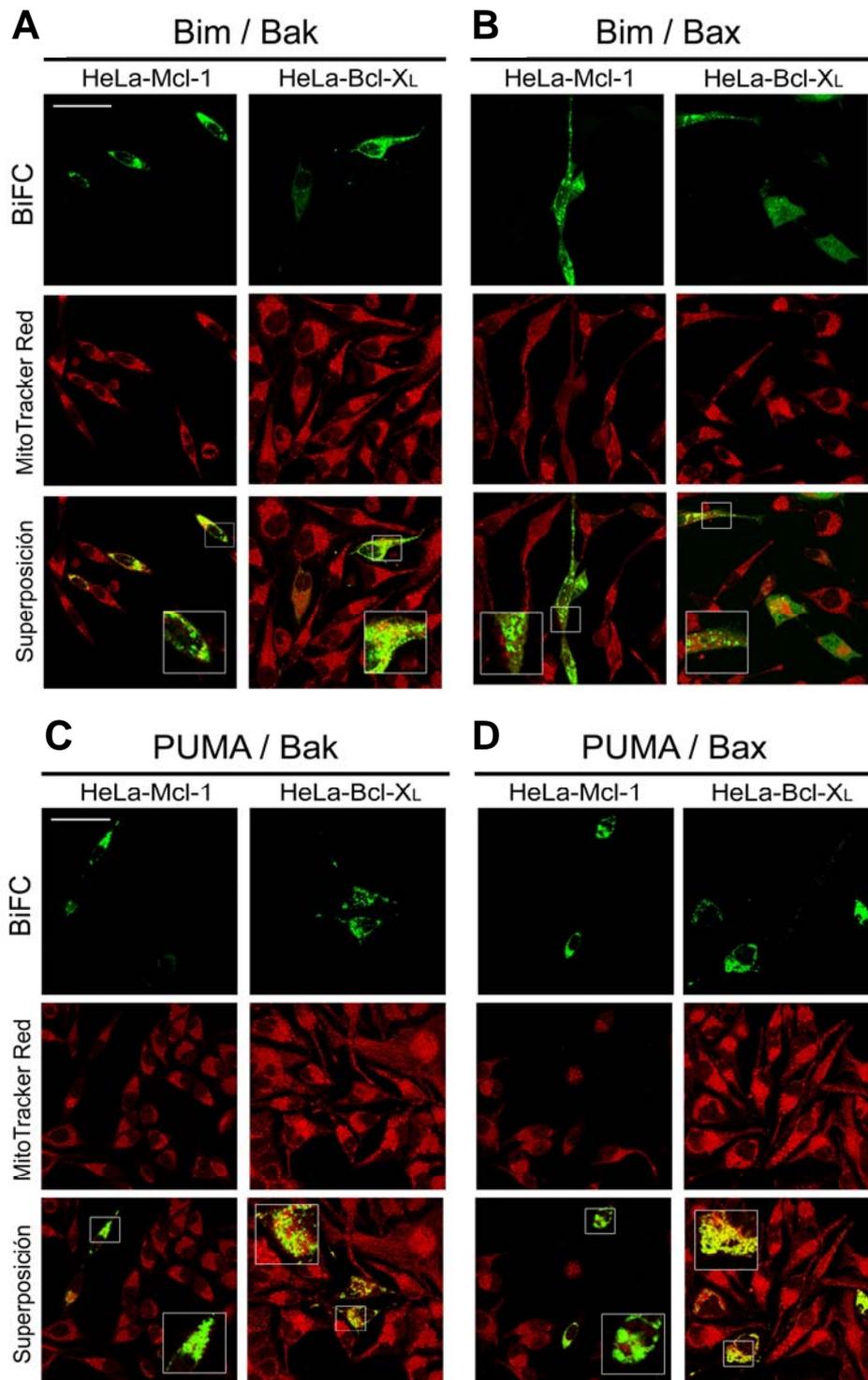
Mediante el tratamiento de las tres líneas derivadas de HeLa con etopósido (100  $\mu$ M) se comprobó que la sobreexpresión de Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub> ofrece una protección parcial, ya que retrasa pero no elimina la caída de potencial mitocondrial inducida por esta droga citotóxica. Se puede apreciar en la siguiente gráfica que a tiempos cortos (24h) las líneas HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> están casi completamente protegidas del efecto del etopósido. Sin embargo a tiempos más largos, de 48 y 72 horas, el porcentaje de células que presenta caída de potencial mitocondrial alcanza incluso los mismos valores que en la línea control. Cabe destacar que la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub> ofrece una mayor protección, coincidiendo con la mayor reducción de las interacciones de Bim y PUMA con Bak y Bax.

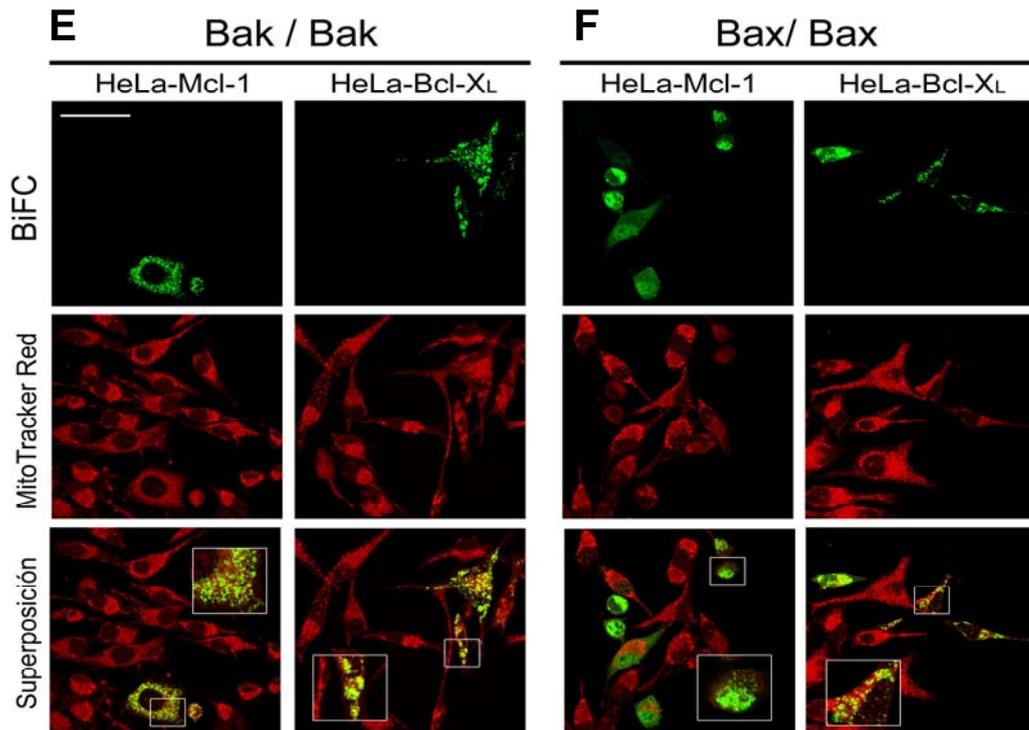


**Figura 4.83 Efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 y Bcl-XL en la toxicidad inducida por etopósido a lo largo del tiempo.** La muerte celular se analizó por citometría de flujo midiendo la caída de potencial mitocondrial con la sonda fluorescente TMRE. Los resultados son media  $\pm$  SD de 3-4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Se visualizaron algunos de los complejos formados por microscopía confocal en las líneas HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> (Figura 4.84). El análisis de la localización subcelular de los complejos fluorescentes reveló que no existían diferencias apreciables en comparación con la línea control. Las parejas Bim/Bak (A), PUMA/Bak (C), PUMA/Bax (D) y los dímeros Bak/Bak (E) presentan una distribución que colocaliza con la sonda mitocondrial MitoTracker Red. Como se ha observado con la línea celular parental, las células transfectadas con las parejas Bim/Bax (B) y Bax/Bax (F) presentan

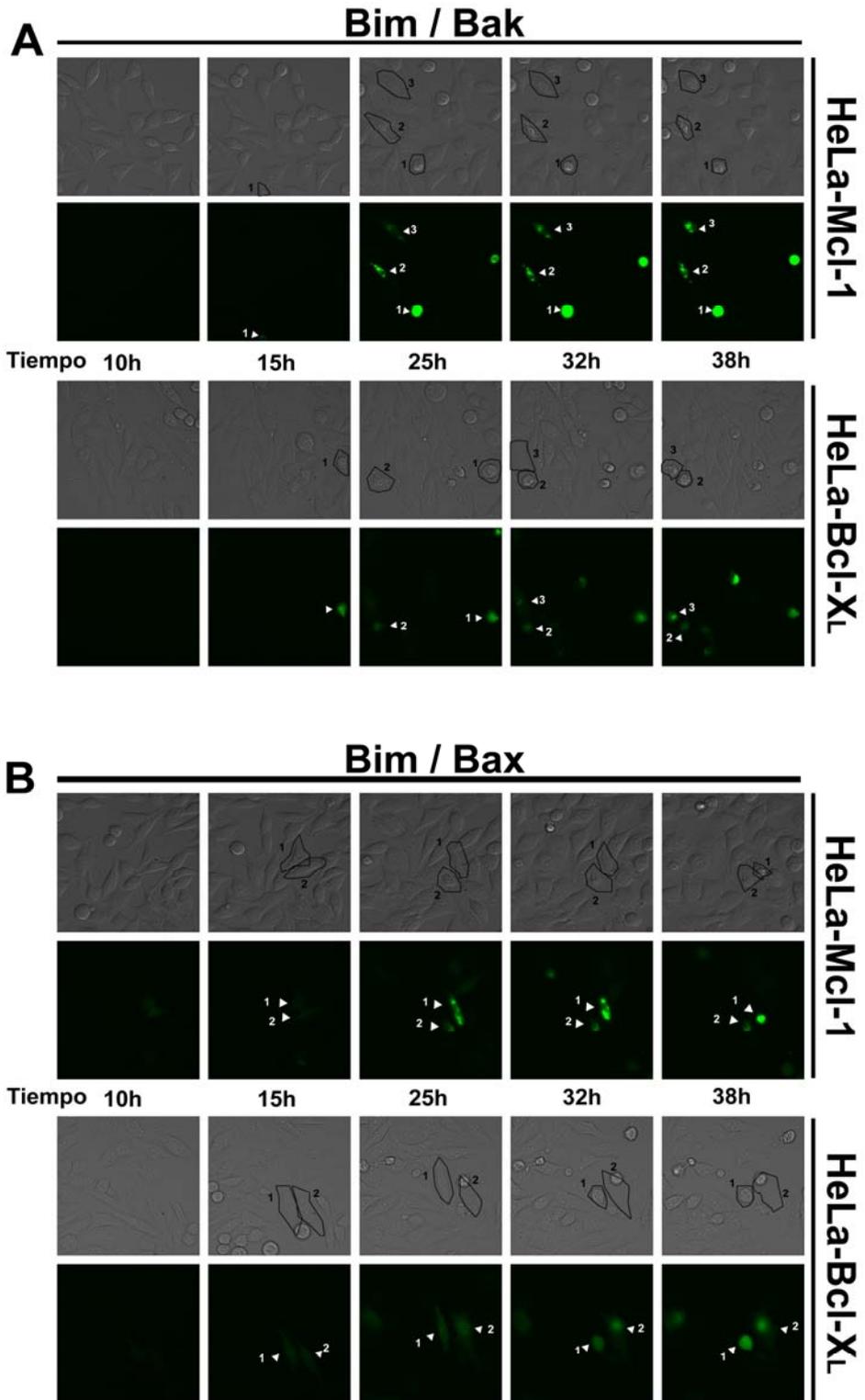
fluorescencia parcialmente citosólica y punteada en algunas células. En la mayoría de casos no se aprecia la caída de potencial mitocondrial en las células que presentan fluorescencia debida a la complementación de fluorescencia. Probablemente la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas protege durante un cierto tiempo de la inducción de apoptosis, como también se observa en la gráfica de la Figura 4.8 y en la Figura 4.83.

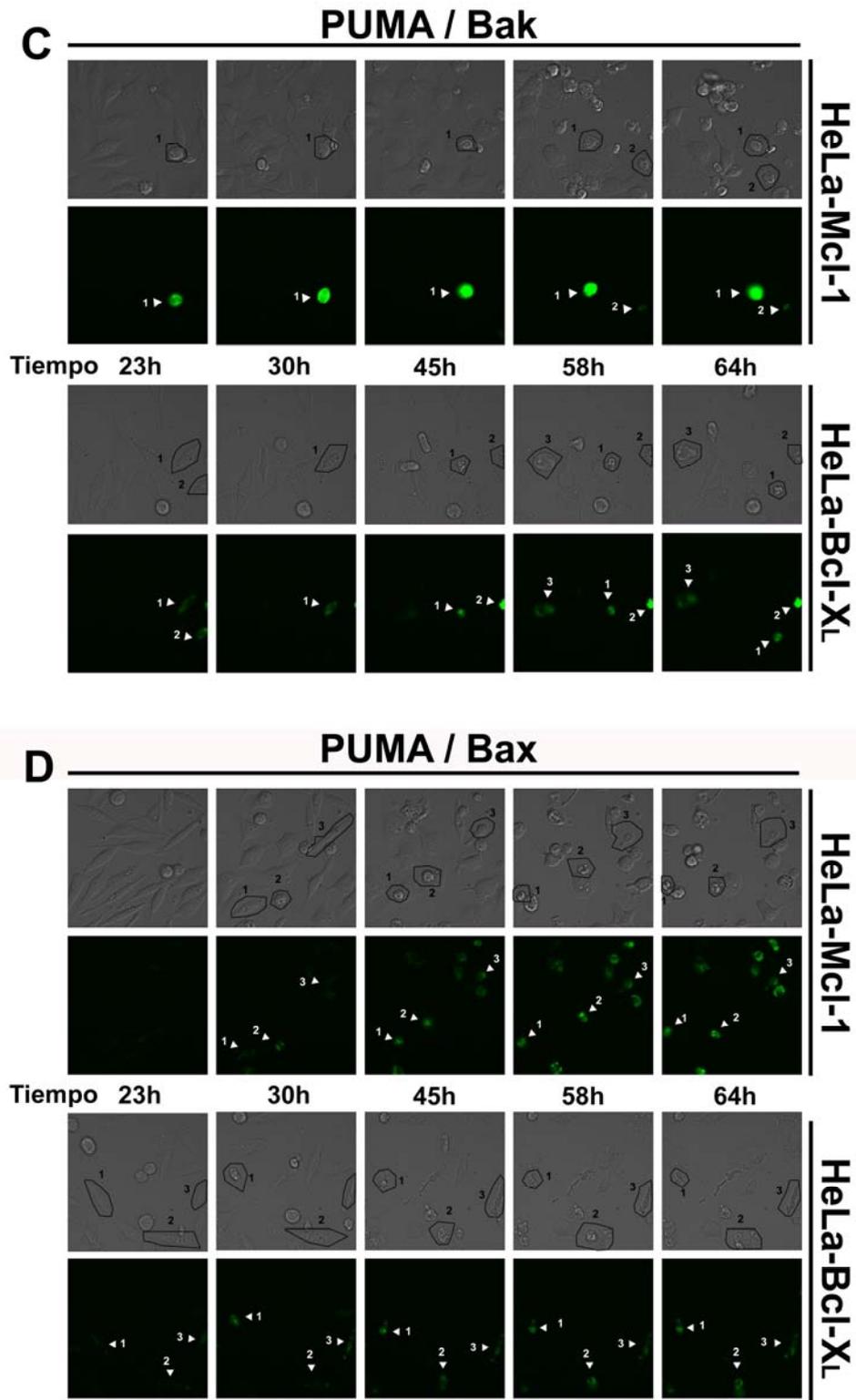




**Figura 4.84 Localización de los complejos de Bim y PUMA con Bak y Bax y de los dímeros Bak/Bak y Bax/Bax.** Imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes planos de las líneas HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> transfectadas con distintas parejas de proteínas proapoptóticas. Escala, 50µm.

Como se había observado una cierta reducción en las interacciones entre proteínas proapoptóticas en las líneas derivadas que sobreexpresan Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>, se decidió analizar la aparición de estos complejos mediante microscopía “time-lapse” (Figura 4.85). Se estudiaron las parejas Bim y PUMA con Bak y Bax. En la siguiente figura se muestran diferentes capturas a tiempos equivalentes a los presentados para la línea parental HeLa (ver figuras 4.43, 4.44 y 4.50).





**Figura 4.85** Secuencia de imágenes representativas capturadas por microscopía “time-lapse” durante 72h a intervalos de 7-8 minutos con una cámara CCD (C9100-02, Hamamatsu) en un microscopio Leica AF6000 LX. Las líneas transfectantes HeLa-Mcl-1 y HeLa-Bcl-X<sub>L</sub> se transfectaron con las parejas Bim/Bak (A), Bim/Bax (B), PUMA/Bak (C) y PUMA/Bax (D) y se visualizó la formación de complejos entre dichas proteínas. El tiempo indicado corresponde a las horas transcurridas desde el momento de la transfección

En términos generales se observa un menor porcentaje de células que adquieren fluorescencia a lo largo del tiempo, indicando que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas reduce o al menos retrasa la interacción entre proteínas proapoptóticas. Además, también se aprecia que un menor número de células adquiere fenotipo apoptótico a tiempos cortos, corroborando el efecto protector que ofrece la mayor expresión de Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub>. No obstante, a tiempos largos y especialmente con las parejas PUMA/Bak y PUMA/Bak las células transfectadas terminan presentando morfología apoptótica. Esta observación indica que la sobreexpresión de Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub> y el efecto del zVAD-fmk ofrecen una protección parcial y durante un tiempo limitado. Probablemente, el aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas a lo largo del tiempo supera la capacidad de neutralización de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>. De esta manera quedarán libres muchas más moléculas de proteínas de fusión proapoptóticas, que podrán interactuar con las respectivas parejas de proteínas de fusión e inducir la apoptosis en las células.

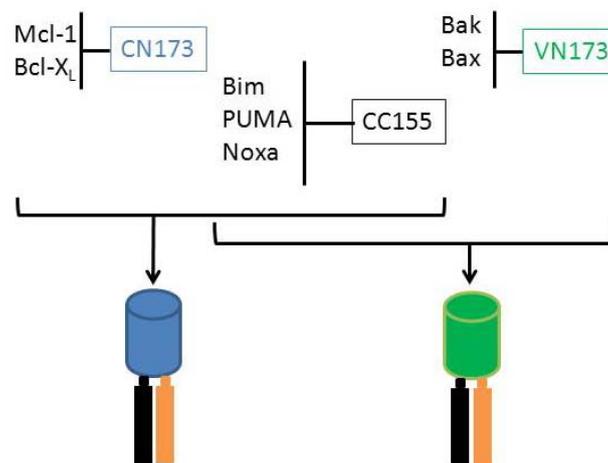
#### **4.6 COMPETICIÓN ENTRE PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS Y BAX/BAK POR UNIRSE A PROTEÍNAS “SÓLO-BH3”.**

Una vez se hubieron analizado las interacciones entre diversas parejas de proteínas de la familia Bcl-2, se planteó la posibilidad de estudiar la formación de diferentes complejos simultáneamente. Para ello se utilizó la técnica BiFC multicolor, cuya descripción se detalla en el apartado 2.5.2.3.2 de la Introducción (página 62). Esta técnica se basa en la complementación entre fragmentos de diferentes proteínas fluorescentes que forman complejos bimoleculares con espectros de excitación y emisión distintos. De esta manera los complejos formados por la interacción de diferentes parejas se pueden visualizar en la misma célula (Kerppola 2008). Mediante esta técnica es posible analizar la competición que establecen dos proteínas distintas para asociarse con una pareja de interacción común.

Para llevar a cabo la técnica BiFC multicolor es necesario que las proteínas que van a competir por unirse a la proteína común estén fusionadas a los fragmentos amino de dos proteínas fluorescentes distintas (Figura 4.86). En este trabajo se han empleado los fragmentos de las proteínas Venus (VN173) y Cerulean (CN173), cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión son 515/528 y 434/477, respectivamente. Los aminoácidos implicados en la formación del fluoróforo se localizan dentro de este fragmento amino de las proteínas fluorescentes de manera

que cuando la tercera proteína interactuare con una de las anteriores el complejo formado emitirá una de las dos fluorescencias posibles. Se ha empleado el fragmento carboxilo de la proteína Cerulean (CC155) para fusionarlo a la proteína común (Figura 4.86). Se había determinado anteriormente que este fragmento era capaz de complementarse tanto con VN173 y CN173 y era el que se había utilizado en otros trabajos publicados en la bibliografía (Hu and Kerppola 2003; Grinberg et al. 2004; Vidi et al. 2010).

El conjunto de vectores que se construyeron se detalla en la siguiente figura y los oligonucleótidos empleados para cada caso se encuentran en la Tabla 3.3.



**Figura 4.86** Esquema representativo del conjunto de vectores empleados para los ensayos de BiFC multicolor.

Una consideración importante a la hora de realizar los experimentos de BiFC multicolor es que la fusión a fragmentos de diferentes proteínas fluorescentes no debería influir en la eficiencia de formación de los complejos. Por ello se deben intercambiar los fragmentos a los que se encuentran fusionadas las proteínas. En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo la generación de un segundo conjunto de vectores intercambiando los fragmentos VN173 y CN173. Sin embargo este segundo conjunto de vectores no se ha testado en los experimentos de complementación bimolecular. Se han llevado a cabo algunos experimentos iniciales solamente con el primer conjunto de vectores (mostrados en la Figura 4.86) y se han obtenido resultados preliminares.

En primer lugar células HeLa se transfectaron siguiendo las indicaciones del apartado 3.3.1 con las diferentes combinaciones de parejas de proteínas de fusión:

una de las proteínas fusionadas a los fragmentos VN173 o CN173 y cada una de las fusionadas al CC155 por separado. Se determinaron los porcentajes de formación de cada complejo y las intensidades de fluorescencia de cada pareja por separado mediante citometría de flujo (apartado 3.4.2). A continuación se llevaron a cabo las diferentes combinaciones de transfecciones para evaluar la competición por unirse a la proteína común. En estos ensayos la mezcla de transfección contenía una de las proteínas fusionadas al fragmento VN173, una de las fusionadas al CN173 y una de las fusiones con el fragmento CC155. Las proteínas fusionadas al fragmento CC155 se transfectaron en todos los casos en una cantidad limitante (75 ng por cada  $10^5$  células), para que se establezca una competición real entre las otras dos por unirse a ellas. Se transfectaron 150 ng por cada  $10^5$  células de los vectores que contienen los fragmentos VN173 y CN173 y se cotransfectó con la misma cantidad de vector que codifica la mRFP para evaluar el porcentaje de transfección.

En primer lugar se evaluó la competición entre las proteínas Mcl1-/Bcl-X<sub>L</sub> y Bak/Bax por unirse a la proteína “sólo-BH3” Bim. Por una parte se analizaron los porcentajes de células que presentaban complejos VN-CC y CN-CC al transfectar cada pareja por separado. A continuación se evaluó el porcentaje de interacción entre VN-CC y CN-CC dentro de una misma población de células transfectadas con la combinación correspondiente de tres proteínas de fusión. Se puede apreciar en la tabla que los porcentajes de interacción no varían significativamente si se compara cada pareja por separado con los valores de los ensayos de competición.

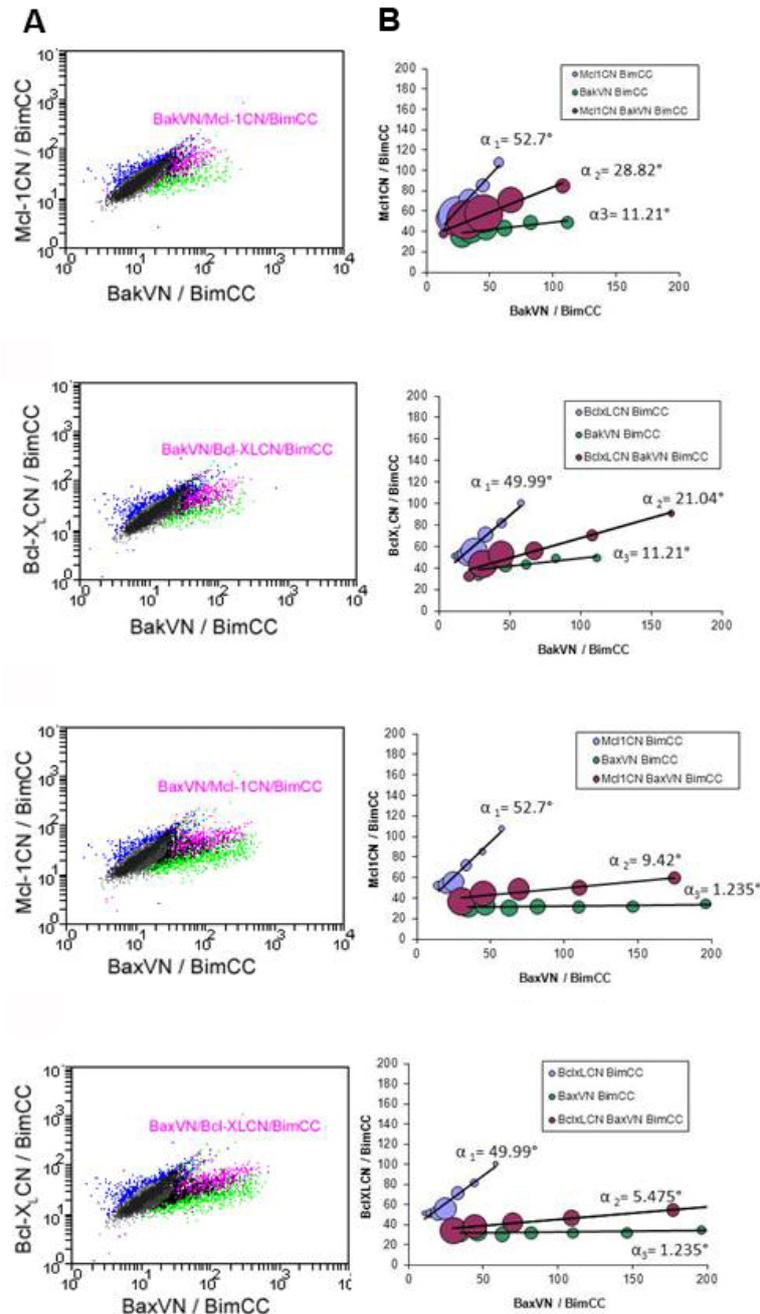
		Mcl1CN / BimCC		Bcl-X <sub>L</sub> CN / BimCC	
	% Células positivas	11,4 ± 0,566		9,875 ± 1,3	
BaxVN / BimCC	21,2 ± 1,27	22,35 ± 1,78	12,4 ± 0,28	19,75 ± 6,29	10,56 ± 1,05
BakVN / Bim CC	9,19 ± 0,071	9,1 ± 3,6	11,9 ± 0,56	8,97 ± 0,23	7,56 ± 4,7

**Tabla 4.1.** Valores de porcentajes de células que presentan complejos fluorescentes CN-CC y VN-CC al transfectar cada pareja por separado o la combinación de tres proteínas. Los colores indican la fluorescencia emitida por los complejos formados. Los resultados son media ± SD de dos experimentos independientes.

En la siguiente figura se muestran los dot plots de cada combinación de parejas de proteínas superpuestos con los de los ensayos de competición (gráficas A). Estos dot

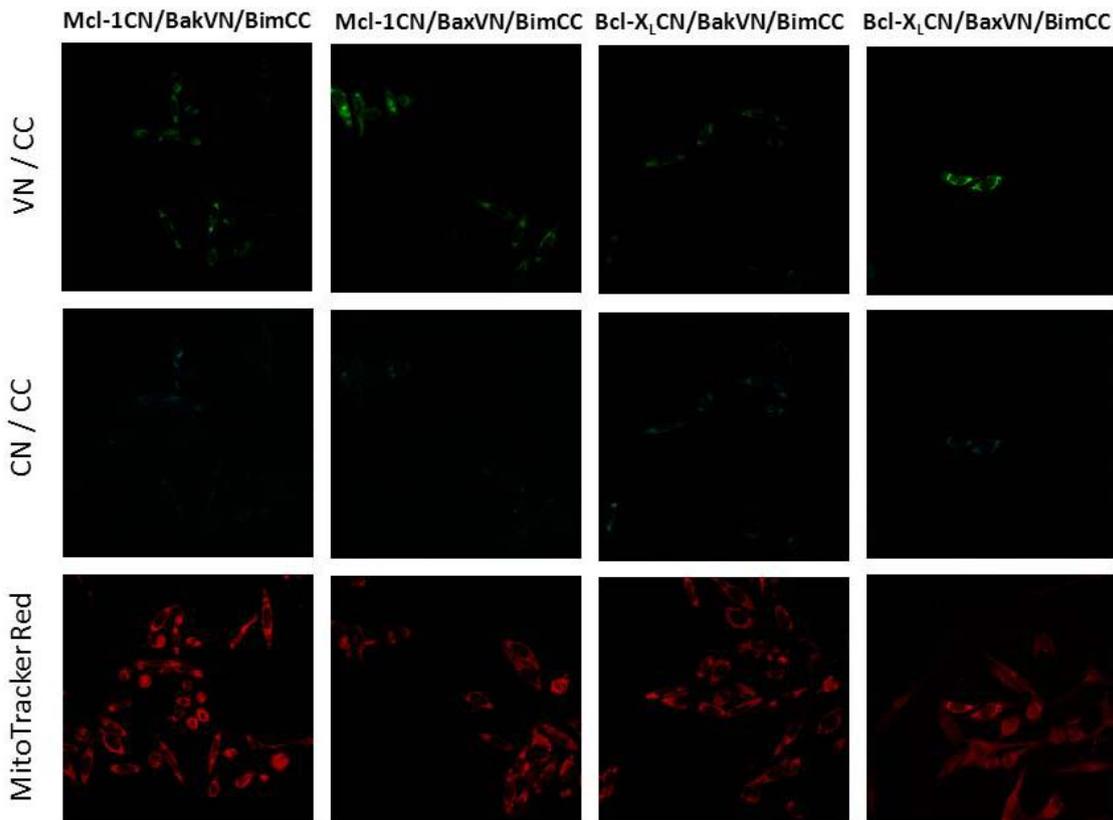
plots representan las intensidades de fluorescencia detectadas al transfectar con las proteínas indicadas. En cada uno, la población marcada en azul corresponde a la fluorescencia emitida por los complejos CN-CC al transfectar una pareja de proteínas. La fluorescencia formada por los complejos VN-CC al transfectar la otra pareja de proteínas se muestra en verde y finalmente la población marcada en rosa corresponde a la fluorescencia emitida por los complejos CN-CC y VN-CC cuando se transfectan las tres proteínas de fusión. En todos los casos se aplicó previamente un proceso de “gating” sobre la población de células mRFP positivas, para seleccionar solamente las células transfectadas. La población que aparece en gris oscuro corresponde a las células que solamente emiten fluorescencia roja debida a la mRFP, pero no emiten fluorescencia por formación de complejos CN-CC o VN-CC. A la derecha de cada dot plot se muestra el análisis de regresión lineal de cada población (gráficas B). Este estudio se realizó con el objetivo de tener un dato cuantitativo sobre la preferencia de interacción de BimCC con las diferentes parejas. Para ello se dividió cada dot plot por separado en 15 regiones utilizando el software Weasel y se representaron las medias de las intensidades de fluorescencia del eje de las x y del eje de las y (en unidades arbitrarias)(Figura 4.87). La sucesión de puntos obtenidos se ajustó a una recta y se calculó el valor de la pendiente (m). Con este dato se pudo calcular el ángulo de inclinación de cada recta respecto al eje de abscisas. En las gráficas de dispersión mostradas cada población aparece con su correspondiente ajuste lineal y el valor medio del ángulo de dos experimentos independientes. Se han adaptado las escalas de cada gráfica para una mejor visualización de la distribución de las poblaciones.

Al realizar los experimentos de competición por interactuar con BimCC se observa que las células transfectadas con las tres proteínas de fusión presentan señal de fluorescencia tanto debida a los complejos VN-CC como a los formados por CN-CC. Sin embargo, se puede ver que los ángulos de inclinación de estas poblaciones tienen valores más cercanos a los de las poblaciones transfectadas con las parejas VN-CC, especialmente visible en el caso de Bax (Figura 4.87 B). Además, los valores de los ángulos de las poblaciones parecen indicar que Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> compiten de manera similar con Bax o Bak por unirse a Bim (Figura 4.87 B).



**Figura 4.87 Visualización de la competición entre diferentes parejas por la interacción con BimCC. (A)** Las proteínas indicadas se transfetaron en células HeLa por parejas y en combinaciones de tres. Se muestra la superposición de los tres dot plots individuales. Cabe destacar que la superposición de poblaciones fuera de la región gris (correspondiente a las células positivas sólo para mRFP) origina color negro en los dot plots. **(B)** Representación de las intensidades medias de fluorescencia en cada región de las diferentes poblaciones después de transfectar con las proteínas de fusión indicadas (RFU). El ángulo de las pendientes de cada regresión lineal refleja la afinidad relativa de asociación de las diferentes parejas en cada experimento. El tamaño de cada burbuja representa la densidad poblacional en los valores de intensidad de fluorescencia indicados. Los valores de los ángulos son media de dos experimentos independientes.

Finalmente se visualizaron los complejos fluorescentes mediante microscopía confocal en aquellas células que se habían transfectado con las combinaciones de tres proteínas (Figura 4.88). Como se puede apreciar en las fotografías la intensidad de fluorescencia de los complejos CN/CC es muy baja y eso dificulta su visualización. No obstante parece que las células presentan tanto complejos VN/CC como CN/CC y que éstos parecen tener localización mitocondrial, por comparación con la sonda MitoTracker Red.



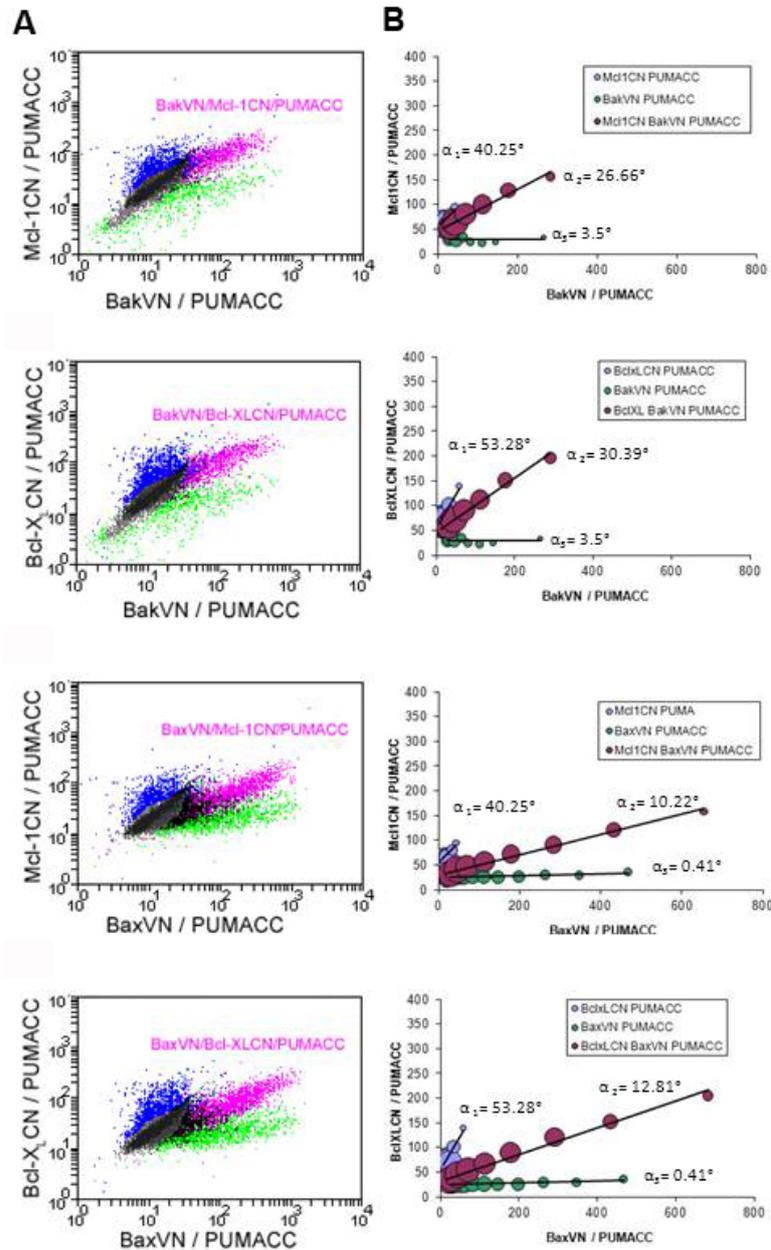
**Figura 4.88** Visualización por microscopía confocal de los complejos CN-CC y VC-CC formados al transfectar las células con las proteínas indicadas.

A continuación se llevó a cabo el mismo análisis de competición para la proteína “sólo-BH3” PUMA. En estos experimentos se han obtenido porcentajes de interacción más elevados para todas las parejas si se compara con los obtenidos para BimCC. Además, los valores de porcentajes de interacción al realizar los experimentos de competición sufren cambios más importantes respecto a los valores de cada pareja por separado. Cabe destacar que cuando se transfectan las células con una combinación de tres proteínas de fusión y Bax se encuentra presente se observa un aumento mayor en el porcentaje de células que presentan complejos VN-CC.

		Mcl1CN / PUMACC		Bcl-X <sub>L</sub> CN / PUMACC	
	<b>% Células positivas</b>	18,75 ± 1,77		21,55 ± 0,92	
<b>BaxVN / PUMACC</b>	30,25 ± 4,031	40,15 ± 2,45	24,2 ± 2,4	42,15 ± 1,77	28,5 ± 1,69
<b>BakVN / PUMACC</b>	15,1 ± 1,62	20,25 ± 5,1	22,7 ± 4,66	19,3 ± 6,93	24,95 ± 4,6

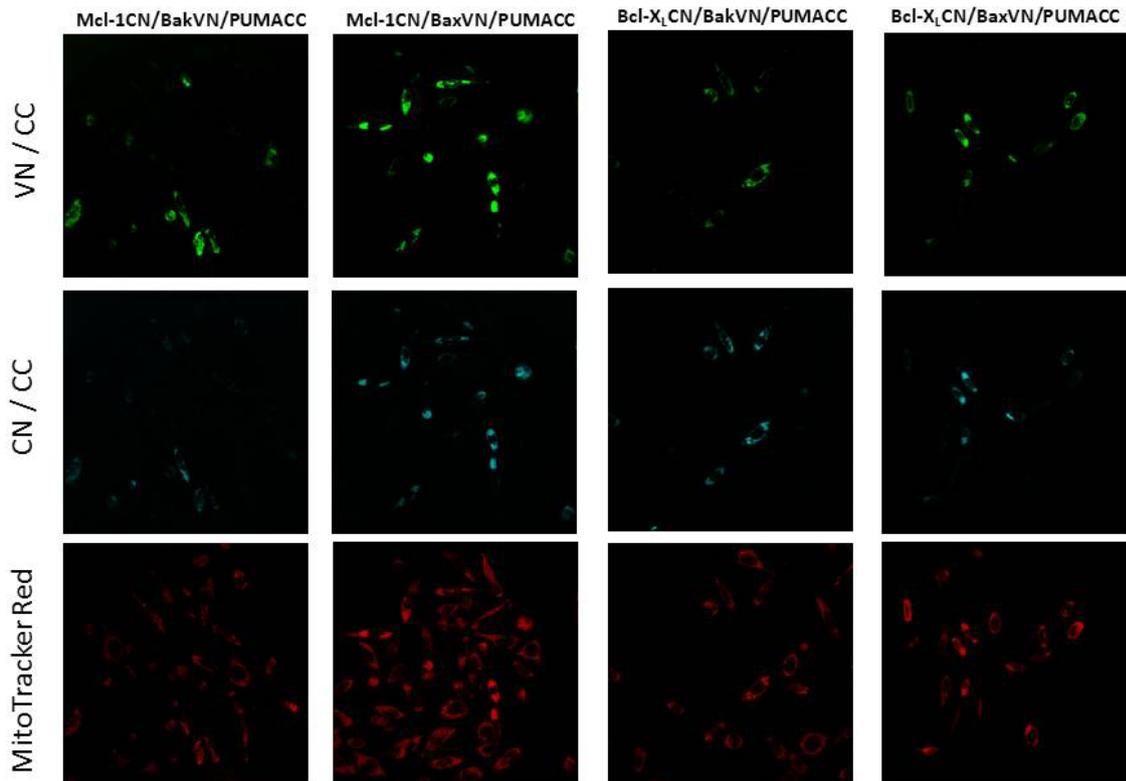
**Tabla 4.2.** Valores de porcentajes de células que presentan complejos fluorescentes CN-CC y VN-CC al transfectar cada pareja por separado o la combinación de tres proteínas. Los colores indican la fluorescencia emitida por los complejos formados. Los resultados son media ± SD de dos experimentos independientes.

Cuando se analizan las intensidades de fluorescencia en la superposición de los dot plots se puede apreciar que los complejos formados por Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> con PUMA tienen unas intensidades de fluorescencia más elevadas que los formados con Bim (Figura 4.89 A). También los porcentajes de interacción son mayores tanto para dichos complejos como para los formados con las proteínas Bak y Bax, como se muestra en la tabla anterior. Cualitativamente se puede observar que la población correspondiente a las células transfectadas con las tres proteínas está ligeramente desplazada hacia la fluorescencia verde, especialmente en el caso de que Bax esté presente (Figura 4.89 A). En este caso además, parece que Bcl-X<sub>L</sub> compite mejor que Mcl-1 por unirse a PUMA. No obstante, cabe destacar que según los valores de intensidades medias de fluorescencia las células transfectadas con las tres proteínas presentan ambos tipos de complejos. Esta observación se aprecia también en las fotografías de microscopía confocal de la Figura 4.91. Se llevó a cabo el mismo análisis de regresión lineal de las intensidades de fluorescencia de cada experimento, y las rectas obtenidas así como los ángulos de sus pendientes se muestran en las gráficas B de la siguiente figura. Los valores de los ángulos indicarían una cierta preferencia de PUMA por interaccionar con Bax. Por otra parte, y especialmente en presencia de Bak, se observa que Bcl-X<sub>L</sub> compite mejor que Mcl-1 por unirse a la proteína “sólo-BH3” PUMA. Además, resulta llamativo que al realizar los ensayos de competición se alcanzan valores de intensidad de fluorescencia debida a lo complejos CN-CC mayores a los obtenidos cuando se transfecta la pareja correspondiente por separado.



**Figura 4.89 Visualización de la competición entre diferentes parejas por la interacción con PUMACC.** (A) Las proteínas indicadas se transfectaron en células HeLa por parejas y en combinaciones de tres. Se muestra la superposición de los tres dot plots individuales. Cabe destacar que la superposición de poblaciones fuera de la región gris (correspondiente a las células positivas sólo para mRFP) origina color negro en los dot plots. (B) Representación de las intensidades medias de fluorescencia en cada región de las diferentes poblaciones después de transfectar con las proteínas de fusión indicadas (RFU). El ángulo de las pendientes de cada regresión lineal refleja la afinidad relativa de asociación de las diferentes parejas en cada experimento. El tamaño de cada burbuja representa la densidad poblacional en los valores de intensidad de fluorescencia indicados. Los valores de los ángulos son media de dos experimentos independientes.

Las fotografías de microscopía confocal muestran que hay un porcentaje relativamente elevado de células que presentan tanto complejos de Mcl-1/Bcl-X<sub>L</sub> con PUMA como de Bak/Bax con la misma (Figura 4.90). Además, la intensidad de fluorescencia de estos complejos es mucho más elevada que la detectada para Bim, como ya se podía apreciar en la distribución de las poblaciones de los dot plots mostrados en la Figura 4.89. También en este caso los complejos parecen localizarse en las mitocondrias, si se compara la distribución con la sonda MitoTracker Red.



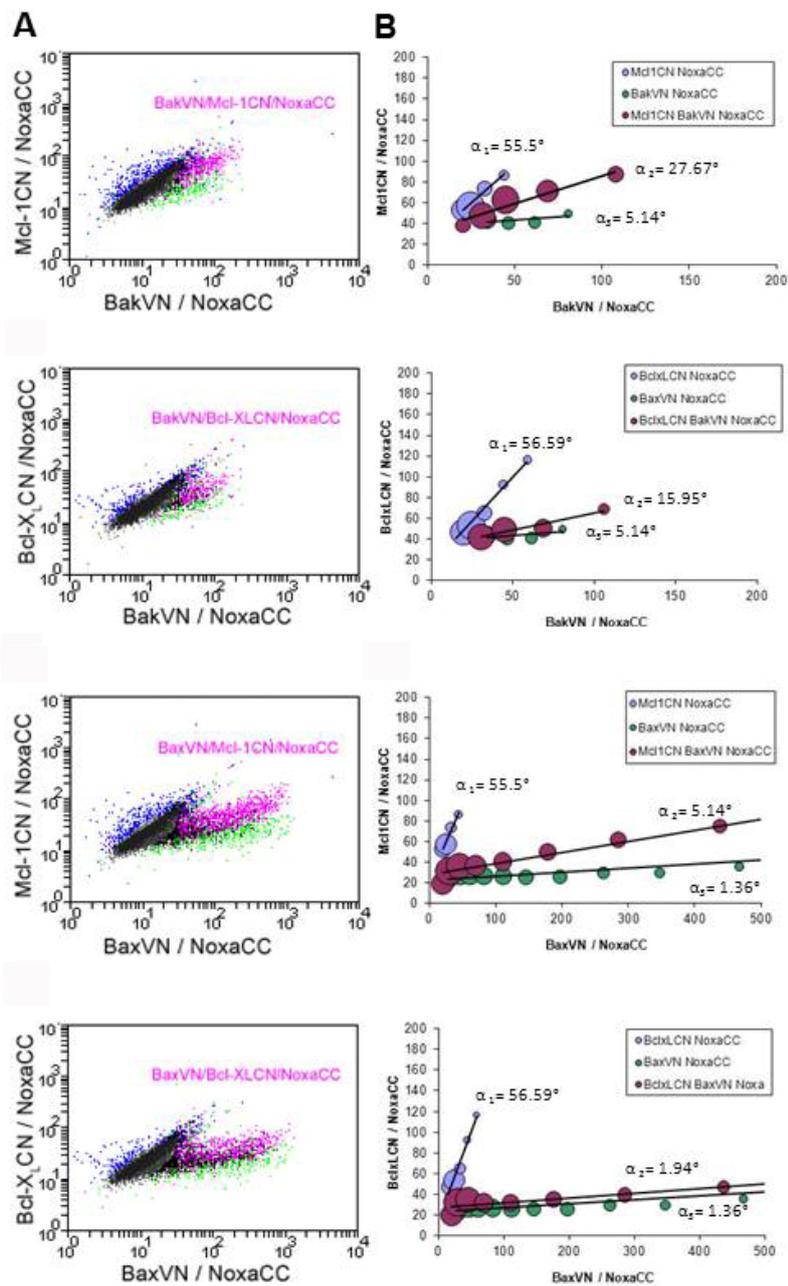
**Figura 4.90** Visualización por microscopía confocal de los complejos CN-CC y VC-CC formados al transfectar las células con las proteínas indicadas.

Finalmente se analizó la competición establecida entre las proteínas Bak/Bax y Mcl-1/Bcl-X<sub>L</sub> por su interacción con Noxa. En este caso cabe destacar que se han obtenido porcentajes bajos de interacción salvo en la pareja BaxVN/NoxaCC. Además, se aprecia un aumento relativamente importante en el porcentaje de interacción de esta pareja cuando se realizan los ensayos de competición por unión a Noxa.

	% Células positivas	Mcl1CN / NoxaCC		Bcl-X <sub>L</sub> CN / NoxaCC	
		10,28 ± 0,59		8,86 ± 1,75	
BaxVN / NoxaCC	14,75 ± 4,31	24,75 ± 1,2	11,2 ± 1,31	24,5 ± 1,41	10,73 ± 3,2
BakVN / NoxaCC	7,72 ± 0,32	9,15 ± 5,3	12,2 ± 3,11	8,73 ± 2,78	9,44 ± 1,36

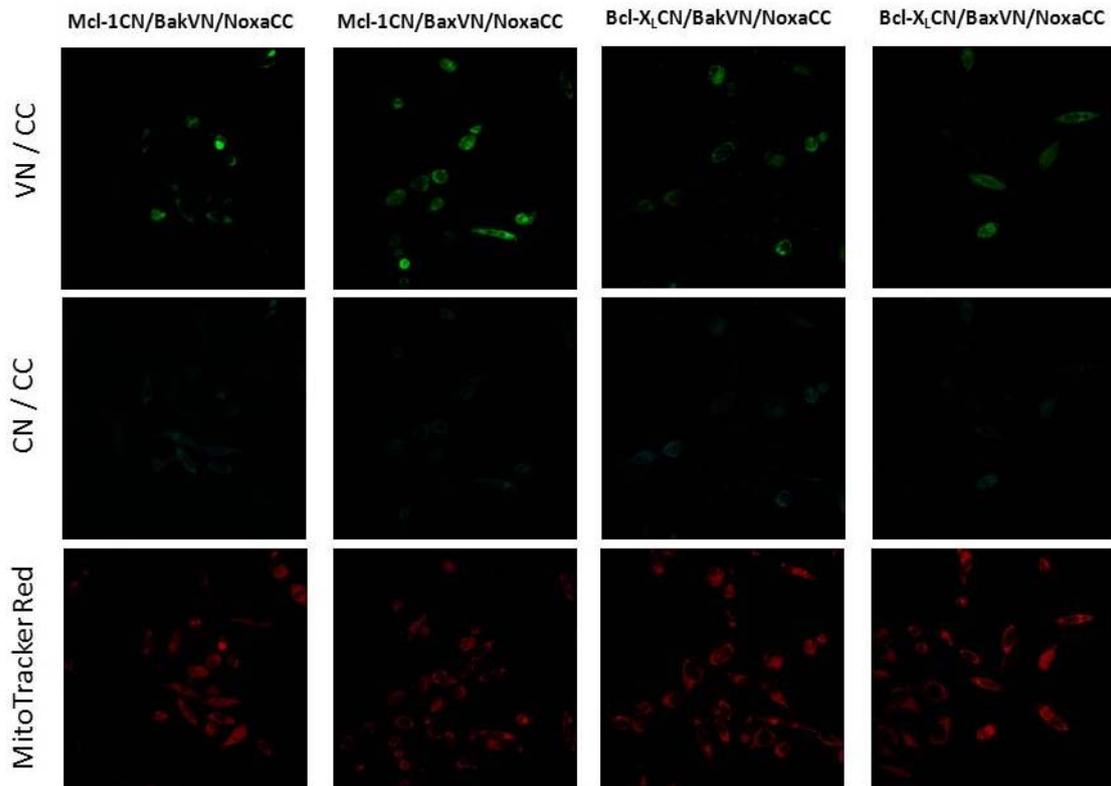
**Tabla 4.3.** Valores de porcentajes de células que presentan complejos fluorescentes CN-CC y VN-CC al transfectar cada pareja por separado o la combinación de tres proteínas. Los colores indican la fluorescencia emitida por los complejos formados. Los resultados son media ± SD de dos experimentos independientes.

Al analizar los dot plots de las diferentes combinaciones de transfecciones, se observa que, como se muestra en la tabla anterior, hay un porcentaje muy pequeño de células que presentan complejos CN-CC y que éstos tienen una media de intensidad de fluorescencia baja (Figura 4.91). Se puede apreciar también que hay más células con complejos VN-CC y de mayor intensidad de fluorescencia. Además, al transfectar con las tres proteínas de fusión (población rosa) hay un aumento del porcentaje de interacción que, de forma cualitativa, parece tener una distribución más desplazada hacia el eje de la fluorescencia verde, especialmente visible con Bax, como en los experimentos con las otras dos proteínas “sólo-BH3”. El ajuste por regresión lineal de las diferentes poblaciones transfectadas con las correspondientes combinaciones de proteínas se muestra en las gráficas B de la Figura 4.91. Los valores de los ángulos de inclinación de las rectas obtenidas indican que existe una clara preferencia de interacción con Bax frente a Mcl-1 o Bcl-X<sub>L</sub>. Además, también destaca que en presencia de Bak, Mcl-1 tiene mucha más capacidad de competir por su unión a Noxa que Bcl-X<sub>L</sub>.



**Figura 4.91 Visualización de la competición entre diferentes parejas por la interacción con NoxaCC. (A)** Las proteínas indicadas se transfectaron en células HeLa por parejas y en combinaciones de tres. Se muestra la superposición de los tres dot plots individuales. Cabe destacar que la superposición de poblaciones fuera de la región gris (correspondiente a las células positivas sólo para mRFP) origina color negro en los dot plots. **(B)** Representación de las intensidades medias de fluorescencia en cada región de las diferentes poblaciones después de transfectar con las proteínas de fusión indicadas (RFU). El ángulo de las pendientes de cada regresión lineal refleja la afinidad relativa de asociación de las diferentes parejas en cada experimento. El tamaño de cada burbuja representa la densidad poblacional en los valores de intensidad de fluorescencia indicados. Los valores de los ángulos son media de dos experimentos independientes.

En la Figura 4.92 se muestran las fotografías de microscopía confocal de los complejos formados en las células transfectadas con las combinaciones de proteínas indicadas. De nuevo se puede ver que la fluorescencia de los complejos CN/CC es muy baja lo cual hace que sea muy difícil visualizar correctamente esos complejos. No obstante, las imágenes muestran que la mayoría de las células presentan ambos tipos de complejos, los cuales probablemente colocalizan con las mitocondrias de las células.



**Figura 4.95** Visualización por microscopía confocal de los complejos CN-CC y VC-CC formados al transfectar las células con las proteínas indicadas.

Los experimentos de BiFC multicolor realizados en esta tesis doctoral son muy preliminares y solamente permiten afirmar que pueden existir diferencias importantes en las interacciones que se establecen entre parejas de proteínas cuando se encuentra presente una proteína competidora. En todas las interacciones estudiadas en estos experimentos los complejos formados por complementación de los fragmentos CN-CC tienen una intensidad de fluorescencia mucho menor que la de los complejos VN-CC. Probablemente las longitudes de onda utilizadas tanto por el citómetro de flujo (405 nm) y el microscopio confocal (488 nm) para excitar a los fragmentos CN-CC no sean las óptimas, ya que la proteína Cerulean tiene su máximo

de excitación a 434 nm. Por esta razón sería imprescindible emplear la segunda combinación de vectores para comprobar si al intercambiar los fragmentos de las proteínas fluorescentes cambia también la tendencia de la población transfectada con las tres proteínas. Así, esta técnica permitirá comparar eficiencias relativas de interacción siempre que los fragmentos de las proteínas fluorescentes empleadas no alteren la selectividad de las interacciones entre las proteínas estudiadas (Grinberg et al. 2004; Kerppola 2008). Además, estas eficiencias de formación de complejos bimoleculares están afectadas por los niveles de expresión de las proteínas. Por lo tanto sería esencial analizar dichos niveles en cada experimento de transfección mediante western-bot, tal y como se ha realizado en el resto de experimentos de BiFC mostrados en este trabajo. Por todo esto, la única conclusión a la que los resultados nos permiten llegar es que la técnica BiFC multicolor puede ser de gran utilidad para comparar las eficiencias de formación de complejos y las localizaciones subcelulares de éstos, siempre y cuando se cuente con los controles necesarios.

# DISCUSIÓN GENERAL

---



El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar las posibles interacciones que se establecen entre proteínas de la familia Bcl-2. Para ello se ha utilizado la técnica de BiFC, Complementación Bimolecular de Fluorescencia. Esta técnica permite detectar interacciones de proteínas en células vivas a bajas concentraciones y es especialmente valiosa para determinar la localización subcelular de los complejos formados. Además, la visualización de las interacciones entre proteínas se da en un contexto biológico relevante, de manera que aumenta la probabilidad de que los resultados reflejen las propiedades de las proteínas nativas de manera más precisa, incluyendo los posibles efectos de modificaciones post-traduccionales. La principal limitación que plantea esta técnica es la irreversibilidad de los complejos que se forman, debido al plegamiento de los dos fragmentos de la proteína fluorescente en el barril beta característico de su estructura terciaria (Hu 2002, Hu and Kerppola 2003, Kerppola 2006 y 2008). Sin embargo, esta limitación resulta ventajosa a la hora de estudiar interacciones transitorias, por lo que su aplicación en las interacciones de las proteínas de la familia Bcl-2 es de especial interés. Una consideración clave a la hora de interpretar los resultados obtenidos por BiFC, es la necesidad de disponer de controles apropiados para descartar interacciones no específicas y falsos positivos. De manera ideal, estos controles deberían de consistir en mutaciones específicas en las proteínas de fusión que rompan las interacciones entre las proteínas estudiadas.

En este trabajo se han analizado diversas interacciones entre proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas multidominio o “sólo-BH3”. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que entre esta familia de proteínas se establece una compleja red de interacciones que regula la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Nuestros datos concuerdan con características de los dos modelos de activación de Bak/Bax propuestos hasta el momento, el directo y el indirecto. De esta manera, se podría definir un **modelo unificado** que integra los rasgos fundamentales de los dos anteriores y que está de acuerdo con diversos trabajos publicados recientemente (Leber et al. 2007; Bogner et al. 2010; Leber et al. 2010; Llambi et al. 2011).

Por una parte se ha determinado la capacidad de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1 de interactuar con proteínas “sólo-BH3” y en menor medida con las proteínas Bak y Bax. La unión de las proteínas Bim, PUMA y Noxa con moléculas de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> implicaría la participación del dominio BH3 de las primeras. En la asociación de Bak y Bax con dichos miembros antiapoptóticos podría participar tanto el dominio BH3 como la parte trasera formada por las hélices  $\alpha$  1 y 6 de Bak y Bax. La alta afinidad de proteínas “sólo-BH3” por Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> sugiere que cuando las

primeras son inducidas por un estímulo apoptótico van a poder liberar a la pequeña fracción de moléculas de Bak y Bax neutralizadas por la antiapoptóticas y que éstas podrán posiblemente realizar un bucle de autoactivación de más proteínas Bak/Bax. Por otra parte cuando la inducción de proteínas “sólo-BH3” sea tan elevada como para superar la capacidad de bloqueo de proteínas como Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>, las mismas proteínas “sólo-BH3” podrán llevar a cabo la activación de Bak/Bax por interacción directa con ellas. En este trabajo se ha demostrado la capacidad de asociación de las proteínas Bim, PUMA y Noxa tanto con Bak como con Bax. De esta manera, es plausible que frente a ciertos estímulos apoptóticos o en determinados modelos celulares, proteínas “sólo-BH3” como PUMA y Noxa, cuya función activadora puede no ser la predominante, cobre mayor relevancia. Se ha podido observar asimismo la implicación de la primera hélice  $\alpha$  de Bax así como del dominio BH3 de Bak en las interacciones con las proteínas “sólo-BH3”. Cabe destacar que las interacciones detectadas entre estas proteínas ocurren predominantemente en las mitocondrias de las células, poniendo de manifiesto el papel esencial que estos orgánulos juegan en la vía intrínseca de la apoptosis. Una vez Bak y Bax son activados, llevan a cabo un proceso de dimerización y oligomerización que culmina en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa.

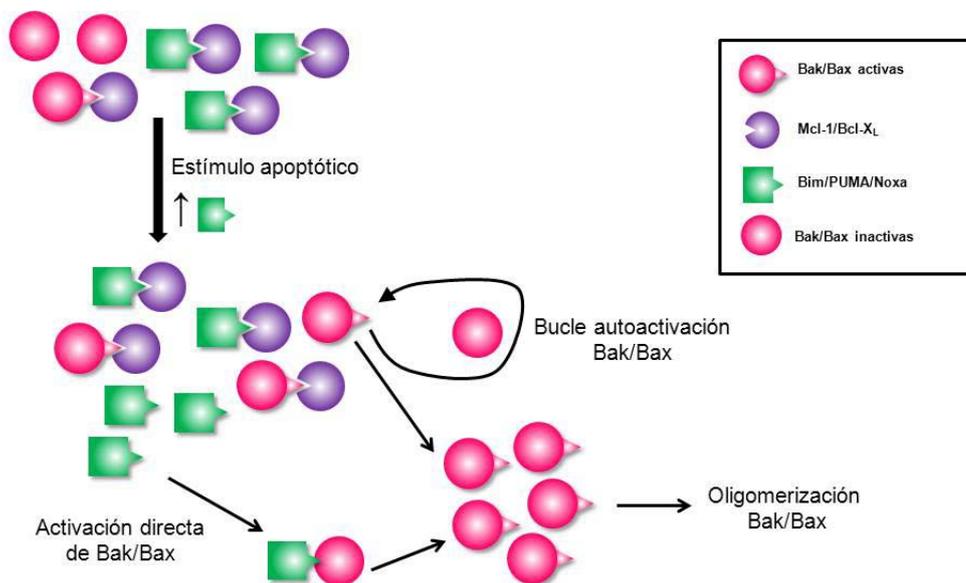


Figura 4.95. Modelo propuesto para la activación de Bax y Bak.

Como ya se ha mencionado, nuestros resultados aportan datos interesantes acerca de la compleja red de interacciones que se establece entre las proteínas de esta importante familia. No obstante, existen diversas aplicaciones de la técnica BiFC que podrían complementar este trabajo.

Por una parte, sería muy interesante obtener líneas estables que expresaran parejas de las proteínas de fusión generadas en este trabajo, de manera que estuvieran bajo el control de promotores inducibles. De esta forma, sería posible analizar las interacciones en un entorno celular en que el nivel de expresión sería más controlable que al realizar transfecciones transitorias. Además, al trabajar con líneas estables se podría estudiar el efecto de distintos estímulos apoptóticos, como el tratamiento con drogas citotóxicas, sobre las interacciones detectadas.

Por otro lado existe la posibilidad de acoplar la técnica BiFC a ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para visualizar interacciones entre tres proteínas (Rebois et al. 2008; Shyu et al. 2008). En estos ensayos el fluoróforo que se reconstituye mediante la complementación por BiFC puede servir como aceptor o donador de energía para el FRET. Las proteínas Venus y Cerulean se han aplicado para estos ensayos de manera satisfactoria.

Finalmente sería de especial interés poder aplicar la técnica BiFC al estudio de interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 en modelos animales *in vivo*. Existen trabajos publicados en los que se ha visualizado interacciones entre proteínas en *Xenopus laevis* (Saka and Smith 2007), *Dario rerio* (Harvey and Smith 2009), *Caenorabditis elegans* (Chen et al. 2007a) y *Drosophila melanogaster* (Gohl et al. 2010). Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se utilizan ratones para visualizar interacciones entre las parejas YFPN-Bax/ YFPC-Bax y Cit c-NYFP/CYFP-Bax (Yivgi-Ohana et al. 2011). En estos experimentos se llevó a cabo la inyección hidrodinámica de mezclas de los vectores en la vena de la cola de los ratones. Anteriormente se había observado una elevada expresión de vectores no virales de DNA en los hepatocitos al inyectar estos vectores no sólo en la vena hepática si no también directamente en la vena de la cola (Wolff and Budker 2005). Los resultados de Yivgi-Ohana y colaboradores muestran el aumento en la interacción entre Bax-Bax y Bax-Cit c cuando tratan los ratones con anticuerpos anti-Fas para inducir apoptosis (Yivgi-Ohana et al. 2011). Al observar por microscopía multifotónica los hígados de los ratones, los autores detectan un aumento de los hepatocitos que presentan fluorescencia debida a la interacción de las proteínas inyectadas. Además, la tinción

inmunocitoquímica de la caspasa-3 activa mostró la existencia de una correlación con las células en las que había habido interacción Bax-Bax (Yivgi-Ohana et al. 2011).

La aplicación de esta técnica *in vivo* con los vectores generados en esta tesis doctoral podría aportar datos interesantes acerca de las interacciones que se establecen en un entorno biológico relevante en respuesta a diferentes estímulos apoptóticos.

# CONCLUSIONES

---



En este trabajo se han estudiado las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2, optimizando para ello la técnica BiFC. Los resultados obtenidos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. La técnica BiFC permite la visualización de interacciones, muchas de ellas débiles y transitorias, entre proteínas de la familia Bcl-2 en un contexto celular.
2. Las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> interactúan mayoritariamente con proteínas “sólo-BH3”, pudiendo asociarse a Bak/Bax en menor medida.
3. Las proteínas “sólo-BH3” Bim, PUMA y Noxa son capaces de interactuar con las proteínas Bak y Bax a través de su dominio BH3, activando de esta manera la ruta mitocondrial de la apoptosis.
4. Las proteínas Bak y Bax pueden interactuar con las antiapoptóticas a través de su dominio BH3 pero es probable que exista una zona de interacción alternativa que implique la región trasera de las primeras.
5. El dominio BH3 de Bak parece estar involucrado en la unión de proteínas “sólo-BH3”.
6. El sitio de interacción de las proteínas “sólo-BH3” con Bax parece localizarse en el bolsillo trasero de la segunda, implicando su hélice  $\alpha$  1.
7. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un modelo de activación de Bax/Bak que comparte rasgos del modelo indirecto y del directo. En esta compleja red de interacciones juegan un papel fundamental las mitocondrias, donde ocurren la mayor parte de las interacciones.
8. Las proteínas Bak y Bax parecen dimerizar siguiendo mecanismos diferentes. Bak dimeriza siguiendo un modelo de dímeros asimétricos, mientras que Bax forma dímeros simétricos.

9. La sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub> o Mcl-1 retrasa la unión de proteínas “sólo-BH3” con Bak/Bax, pero a tiempos largos se excede su capacidad de neutralización y las proteínas “sólo-BH3” pueden interactuar con las efectoras para activarlas.
  
10. Resultados preliminares empleando la técnica BiFC Multicolor demuestran la existencia de una competición entre las proteínas de la familia Bcl-2 por establecer interacciones entre ellas.

# BIBLIOGRAFÍA

---



- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**(2): 423-432.
- Adams, J.M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**(20): 2481-2495.
- Adams, J.M. and Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**(9): 1324-1337.
- Aguiló Anento, J. 2009. Mecanismos efectores y de activación de linfocitos T citotóxicos y células NK. *Bioquímica y Biología Molecular y Celular Vol. Bioquímica*: Universidad de Zaragoza.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2): 171.
- Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J.A., Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* **24**(12): 2096-2103.
- Antignani, A. and Youle, R.J. 2006. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 685-689.
- Aranovich, A., Liu, Q., Collins, T., Geng, F., Dixit, S., Leber, B., and Andrews, D.W. 2012. Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Mol Cell* **45**(6): 754-763.
- Argos, P. 1990. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol* **211**(4): 943-958.
- Arokium, H., Camougrand, N., Vallette, F.M., and Manon, S. 2004. Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* **279**(50): 52566-52573.
- Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-430.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381): 1305-1308.
- Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* **275**(33): 25255-25261.
- Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J.R., and Reed, J.C. 1993. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* **268**(9): 6511-6519.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., and Korsmeyer, S.J. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human

- lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**(3): 899-906.
- Bao, Q. and Shi, Y. 2007. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**(1): 56-65.
- Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* **20**(11): 3781-3794.
- Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R.J. 1999. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5492-5497.
- Basanez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* **277**(51): 49360-49365.
- Bhat, V., McDonald, C.B., Mikles, D.C., Deegan, B.J., Seldeen, K.L., Bates, M.L., and Farooq, A. 2012. Ligand binding and membrane insertion compete with oligomerization of the BclXL apoptotic repressor. *J Mol Biol* **416**(1): 57-77.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. 2008a. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* **6**(6): e147.
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., and Andrews, D.W. 2008b. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S93-104.
- Bleicken, S., Classen, M., Padmavathi, P.V., Ishikawa, T., Zeth, K., Steinhoff, H.J., and Bordignon, E. 2010. Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J Biol Chem* **285**(9): 6636-6647.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., and Salvesen, G.S. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**(2): 529-541.
- Bogner, C., Leber, B., and Andrews, D.W. 2010. Apoptosis: embedded in membranes. *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 845-851.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., and Kroemer, G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**(3): 1025-1040.
- Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb, R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., and et al. 1995. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* **11**(9): 1921-1928.
- Brock, S.E., Li, C., and Wattenberg, B.W. 2010. The Bax carboxy-terminal hydrophobic helix does not determine organelle-specific targeting but is essential for

- maintaining Bax in an inactive state and for stable mitochondrial membrane insertion. *Apoptosis* **15**(1): 14-27.
- Broker, L.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**(9): 3155-3162.
- Brunelle, J.K. and Letai, A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* **122**(Pt 4): 437-441.
- Brustovetsky, T., Li, T., Yang, Y., Zhang, J.T., Antonsson, B., and Brustovetsky, N. 2010. BAX insertion, oligomerization, and outer membrane permeabilization in brain mitochondria: role of permeability transition and SH-redox regulation. *Biochim Biophys Acta* **1797**(11): 1795-1806.
- Bu, Z. and Callaway, D.J. 2011. Proteins move! Protein dynamics and long-range allostery in cell signaling. *Adv Protein Chem Struct Biol* **83**: 163-221.
- Cartron, P.F., Arokium, H., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F.M. 2005. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem* **280**(11): 10587-10598.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. 2004a. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* **16**(5): 807-818.
- Cartron, P.F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F.M. 2003b. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**(13): 4701-4712.
- Cartron, P.F., Moreau, C., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F.M. 2002. Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett* **512**(1-3): 95-100.
- Cartron, P.F., Oliver, L., Mayat, E., Meflah, K., and Vallette, F.M. 2004c. Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Lett* **578**(1-2): 41-46.
- Cartron, P.F., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., and Vallette, F.M. 2003. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *J Biol Chem* **278**(13): 11633-11641.
- Carvajal-Vergara, X., Tabera, S., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Lopez-Perez, R., Mateo, G., Gutierrez, N., Parmo-Cabanas, M., Teixido, J., San Miguel, J.F., and Pandiella, A. 2005. Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood* **105**(11): 4492-4499.
- Causier, B. 2004. Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **23**(5): 350-367.
- Cereghetti, G.M. and Scorrano, L. 2006. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* **25**(34): 4717-4724.
- Cerroni, L., Volkenandt, M., Rieger, E., Soyer, H.P., and Kerl, H. 1994. bcl-2 protein expression and correlation with the interchromosomal 14;18 translocation in

- cutaneous lymphomas and pseudolymphomas. *J Invest Dermatol* **102**(2): 231-235.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**(5): 351-365.
- Ciruela, F. 2008. Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol* **19**(4): 338-343.
- Conradt, B. and Horvitz, H.R. 1998. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**(4): 519-529.
- Cory, S. and Adams, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-656.
- Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**(53): 8590-8607.
- Coultas, L., Pellegrini, M., Visvader, J.E., Lindeman, G.J., Chen, L., Adams, J.M., Huang, D.C., and Strasser, A. 2003. Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ* **10**(2): 185-192.
- Craig, R.W. 2002. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* **16**(4): 444-454.
- Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341** ( Pt 2): 233-249.
- Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. 2003. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* **17**(23): 2922-2932.
- Cuttle, L., Zhang, X.J., Endre, Z.H., Winterford, C., and Gobe, G.C. 2001. Bcl-X(L) translocation in renal tubular epithelial cells in vitro protects distal cells from oxidative stress. *Kidney Int* **59**(5): 1779-1788.
- Czabotar, P.E., Colman, P.M., and Huang, D.C. 2009. Bax activation by Bim? *Cell Death Differ* **16**(9): 1187-1191.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., Thompson, G.V., Wardak, A.Z., Fairlie, W.D., and Colman, P.M. 2011. Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. *J Biol Chem* **286**(9): 7123-7131.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. 2007. Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(15): 6217-6222.
- Chen, B., Liu, Q., Ge, Q., Xie, J., and Wang, Z.W. 2007a. UNC-1 regulates gap junctions important to locomotion in *C. elegans*. *Curr Biol* **17**(15): 1334-1339.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Differential targeting of

- prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J.C., and Gottlieb, R.A. 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* **276**(33): 30724-30728.
- Chen, Q., Chai, Y.C., Mazumder, S., Jiang, C., Macklis, R.M., Chisolm, G.M., and Almasan, A. 2003. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* **10**(3): 323-334.
- Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., and Grant, S. 2007b. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* **67**(2): 782-791.
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., and Rashmi, R. 2008. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S20-29.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. 2005. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**(5741): 1732-1735.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**(5660): 1010-1014.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**(3): 299-310.
- Chou, C.H., Lee, R.S., and Yang-Yen, H.F. 2006. An internal EELD domain facilitates mitochondrial targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **17**(9): 3952-3963.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., and Bhat, G.K. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**(1): 10-27.
- d'Adda di Fagagna F, R.P., Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **13**(426(6963)): 194-198.
- Dai, H., Smith, A., Meng, X.W., Schneider, P.A., Pang, Y.P., and Kaufmann, S.H. 2011. Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J Cell Biol* **194**(1): 39-48.
- Danial, N.N. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* **13**(24): 7254-7263.
- . 2008. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S53-70.
- Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C., and Hinds, M.G. 2005. Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem* **280**(6): 4738-4744.

- Day, C.L., Smits, C., Fan, F.C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Hinds, M.G. 2008. Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J Mol Biol* **380**(5): 958-971.
- de Duve, C. 1963. The lysosome. *Sci Am* **208**,: 64–72.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S.J., Antonsson, B., Jonas, E.A., and Kinnally, K.W. 2005. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* **16**(5): 2424-2432.
- Dejean, L.M., Ryu, S.Y., Martinez-Caballero, S., Teijido, O., Peixoto, P.M., Kinnally, K.W., and 2011. 2010. MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 1231-1238.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5): 891-901.
- Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Dewson, G. and Kluck, R.M. 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci* **122**(Pt 16): 2801-2808.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. 2009b. Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol Cell* **36**(4): 696-703.
- Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. 2008. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell* **30**(3): 369-380.
- Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. 2012. Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ* **19**(4): 661-670.
- Ding, J., Zhang, Z., Roberts, G.J., Falcone, M., Miao, Y., Shao, Y., Zhang, X.C., Andrews, D.W., and Lin, J. 2010. Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J Biol Chem* **285**(37): 28749-28763.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. 2010. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem* **286**(1): 491-501.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* **11**(13): 1050-1062.
- Edinger, A.L. and Thompson, C.B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-669.

- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* **145**(1): 104-116.
- Edwards, A.N., Fowlkes, J.D., Owens, E.T., Standaert, R.F., Pelletier, D.A., Hurst, G.B., Doktycz, M.J., and Morrell-Falvey, J.L. 2009. An in vivo imaging-based assay for detecting protein interactions over a wide range of binding affinities. *Anal Biochem* **395**(2): 166-177.
- Er, E., Oliver, L., Cartron, P.F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F.M. 2006. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1301-1311.
- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A., and Villunger, A. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* **106**(13): 4131-4138.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J.C. 1998. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol* **143**(1): 217-224.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., and Mihara, K. 2003. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem* **134**(3): 333-344.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C., and Brown, R. 1995. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* **374**(6524): 731-733.
- Fennell, D.A., Chacko, A., and Mutti, L. 2008. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* **27**(9): 1189-1197.
- Ferrer, P.E., Frederick, P., Gulbis, J.M., Dewson, G., and Kluck, R.M. 2012. Translocation of a bak C-terminus mutant from cytosol to mitochondria to mediate cytochrome C release: implications for bak and bax apoptotic function. *PLoS One* **7**(3): e31510.
- Fesik, S.W. 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* **5**(11): 876-885.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fiebig, A.A., Zhu, W., Hollerbach, C., Leber, B., and Andrews, D.W. 2006. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer* **6**: 213.
- Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230): 245-246.
- Fletcher, J.I. and Huang, D.C. 2008a. Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle* **7**(1): 39-44.

- Förster, T. 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* **2**: 55-75.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmelewskij, W., and Villunger, A. 2009. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* **14**(4): 584-596.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-232.
- Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G. 2010. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**(6): 447-464.
- Galan-Malo, P. 2010. Papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por fármacos antitumorales. *Tesis doctoral Universidad de Zaragoza*.
- Gallenne, T., Gautier, F., Oliver, L., Hervouet, E., Noel, B., Hickman, J.A., Geneste, O., Cartron, P.F., Vallette, F.M., Manon, S., and Juin, P. 2009. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol* **185**(2): 279-290.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120.
- Garcia-Saez, A.J., Coraiola, M., Serra, M.D., Mingarro, I., Muller, P., and Salgado, J. 2006. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J* **273**(5): 971-981.
- Garcia-Saez, A.J., Mingarro, I., Perez-Paya, E., and Salgado, J. 2004. Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* **43**(34): 10930-10943.
- Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Davis, M.L., Bird, G.H., and Walensky, L.D. 2010. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol Cell* **40**(3): 481-492.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.C., Kim, H., Cheng, E.H., Tjandra, N., and Walensky, L.D. 2008. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**(7216): 1076-1081.
- George, N.M., Evans, J.J., and Luo, X. 2007. A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev* **21**(15): 1937-1948.
- Gerald, C. 1997. Caspase: the executioner of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1-16.
- Germain, M. and Duronio, V. 2007. The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. *J Biol Chem* **282**(44): 32233-32242.
- Germain, M., Milburn, J., and Duronio, V. 2008. MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction. *J Biol Chem* **283**(10): 6384-6392.

- Ghiotto, F., Fais, F., and Bruno, S. 2010. BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A* **77**(1): 11-21.
- Gilmore, A.P. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1473-1477.
- Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. 2007. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 645-654.
- Gohl, C., Banovic, D., Grevelhorster, A., and Bogdan, S. 2010. WAVE forms hetero- and homo-oligomeric complexes at integrin junctions in *Drosophila* visualized by bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem* **285**(51): 40171-40179.
- Golstein, P. and Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**(1): 37-43.
- Gomez-Bougie, P., Bataille, R., and Amiot, M. 2004. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur J Immunol* **34**(11): 3156-3164.
- . 2005. Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. *Eur J Immunol* **35**(3): 971-976.
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballesteros, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Nunez, G. 1994. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* **120**(10): 3033-3042.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J., and Shore, G.C. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**(1): 207-215.
- Green, D.R. and Chipuk, J.E. 2008. Apoptosis: Stabbed in the BAX. *Nature* **455**(7216): 1047-1049.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5): 903-914.
- Grimm, S. and Noteborn, M. 2010. Anticancer genes: inducers of tumour-specific cell death signalling. *Trends Mol Med* **16**(2): 88-96.
- Grinberg, A.V., Hu, C.D., and Kerppola, T.K. 2004. Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol* **24**(10): 4294-4308.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* **17**(14): 3878-3885.
- Guo, B., Godzik, A., and Reed, J.C. 2001. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **276**(4): 2780-2785.
- Guo, Y., Rebecchi, M., and Scarlata, S. 2005. Phospholipase Cbeta2 binds to and inhibits phospholipase Cdelta1. *J Biol Chem* **280**(2): 1438-1447.

- Hagenbuchner, J., Ausserlechner, M.J., Porto, V., David, R., Meister, B., Bodner, M., Villunger, A., Geiger, K., and Obexer, P. 2010. The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression. *J Biol Chem* **285**(10): 6904-6912.
- Han, J., Goldstein, L.A., Hou, W., Gastman, B.R., and Rabinowich, H. 2010. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem* **285**(29): 22473-22483.
- Han, Z., Hendrickson, E.A., Bremner, T.A., and Wyche, J.H. 1997. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* **272**(20): 13432-13436.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- . 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S.J. 2004. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15313-15317.
- Harris, C.A. and Johnson, E.M., Jr. 2001. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* **276**(41): 37754-37760.
- Harvey, S.A. and Smith, J.C. 2009. Visualisation and quantification of morphogen gradient formation in the zebrafish. *PLoS Biol* **7**(5): e1000101.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12501-12504.
- Heimlich, G., McKinnon, A.D., Bernardo, K., Brdiczka, D., Reed, J.C., Kain, R., Kronke, M., and Jurgensmeier, J.M. 2004. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6. *Biochem J* **378**(Pt 1): 247-255.
- Hinds, M.G. and Day, C.L. 2005. Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr Opin Struct Biol* **15**(6): 690-699.
- Hoetelmans, R., van Slooten, H.J., Keijzer, R., Erkeland, S., van de Velde, C.J., and Dierendonck, J.H. 2000. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* **7**(4): 384-392.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**(6): 489-495.

- Hossini, A.M. and Eberle, J. 2008. Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochem Pharmacol* **76**(11): 1612-1619.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3668-3672.
- Hsu, Y.T. and Youle, R.J. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **272**(21): 13829-13834.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**(4): 789-798.
- Hu, C.D. and Kerppola, T.K. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**(5): 539-545.
- Huang, D.C., Adams, J.M., and Cory, S. 1998. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* **17**(4): 1029-1039.
- Huang, X., Zhai, D., and Huang, Y. 2000. Study on the relationship between calcium-induced calcium release from mitochondria and PTP opening. *Mol Cell Biochem* **213**(1-2): 29-35.
- Hubner, A., Barrett, T., Flavell, R.A., and Davis, R.J. 2008. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* **30**(4): 415-425.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Nunez, G. 1997. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* **16**(7): 1686-1694.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., and Ichijo, H. 2002. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**(46): 43730-43734.
- Ionescu, C.M., Svobodova Varekova, R., Prehn, J.H., Huber, H.J., and Koca, J. 2012. Charge profile analysis reveals that activation of pro-apoptotic regulators Bax and Bak relies on charge transfer mediated allosteric regulation. *PLoS Comput Biol* **8**(6): e1002565.
- Isogai, M., Kawamoto, Y., Inahata, K., Fukada, H., Sugimoto, K., and Tada, T. 2011. Structure and characteristics of reassembled fluorescent protein, a new insight into the reassembly mechanisms. *Bioorg Med Chem Lett* **21**(10): 3021-3024.
- Jabbour, A.M., Heraud, J.E., Daunt, C.P., Kaufmann, T., Sandow, J., O'Reilly, L.A., Callus, B.A., Lopez, A., Strasser, A., Vaux, D.L., and Ekert, P.G. 2009. Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ* **16**(4): 555-563.
- Jeong, S.Y., Gaume, B., Lee, Y.J., Hsu, Y.T., Ryu, S.W., Yoon, S.H., and Youle, R.J. 2004. Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO J* **23**(10): 2146-2155.
- Jeong, S.Y. and Seol, D.W. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* **41**(1): 11-22.

- Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* **159**(6): 931-938.
- Kataoka, T., Holler, N., Micheau, O., Martinon, F., Tinel, A., Hofmann, K., and Tschopp, J. 2001. Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J Biol Chem* **276**(22): 19548-19554.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. 2003. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **160**(1): 53-64.
- Kazi, A., Sun, J., Doi, K., Sung, S.S., Takahashi, Y., Yin, H., Rodriguez, J.M., Becerril, J., Berndt, N., Hamilton, A.D., Wang, H.G., and Sebt, S.M. 2010. The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *J Biol Chem* **286**(11): 9382-9392.
- Kent, K.P., Childs, W., and Boxer, S.G. 2008. Deconstructing green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* **130**(30): 9664-9665.
- Kepp, O., Rajalingam, K., Kimmig, S., and Rudel, T. 2007. Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. *EMBO J* **26**(3): 825-834.
- Kerppola, T.K. 2006. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**(3): 1278-1286.
- . 2006b. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(6): 449-456.
- . 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**: 465-487.
- . 2009. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev* **38**(10): 2876-2886.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* **8**(12): 1348-1358.
- Kim, H., Tu, H.C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. 2009. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **36**(3): 487-499.
- Kim, J.Y., Ahn, H.J., Ryu, J.H., Suk, K., and Park, J.H. 2004. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med* **199**(1): 113-124.

- Kinnally, K.W., Peixoto, P.M., Ryu, S.Y., and Dejean, L.M. 2011. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 616-622.
- Kirkin, V., Joos, S., and Zornig, M. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 229-249.
- Kodama, Y. and Hu, C.D. 2010. An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *Biotechniques* **49**(5): 793-805.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-1173.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3516-3520.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**(19): 4701-4714.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., and Melino, G. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- 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., and Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.
- Ku, B., Liang, C., Jung, J.U., and Oh, B.H. 2011. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res* **21**(4): 627-641.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**(3): 331-342.
- Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* **12**(5): 887-896.

- Lalonde, S., Ehrhardt, D.W., Loque, D., Chen, J., Rhee, S.Y., and Frommer, W.B. 2008. Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J* **53**(4): 610-635.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R.L., and Distelhorst, C.W. 1994. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6569-6573.
- Lama, D. and Sankararamakrishnan, R. 2008. Anti-apoptotic Bcl-XL protein in complex with BH3 peptides of pro-apoptotic Bak, Bad, and Bim proteins: comparative molecular dynamics simulations. *Proteins* **73**(2): 492-514.
- Lanave, C., Santamaria, M., and Saccone, C. 2004. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* **333**: 71-79.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ* **10**(1): 144-145.
- Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. 2007. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* **12**(5): 897-911.
- . 2010. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* **29**(38): 5221-5230.
- Lee, E.F., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Deshayes, K., Zobel, K., Colman, P.M., and Fairlie, W.D. 2007. Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ* **14**(9): 1711-1713.
- Lee, E.F., Czabotar, P.E., van Delft, M.F., Michalak, E.M., Boyle, M.J., Willis, S.N., Puthalakath, H., Bouillet, P., Colman, P.M., Huang, D.C., and Fairlie, W.D. 2008. A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation. *J Cell Biol* **180**(2): 341-355.
- Lee, E.F. and Fairlie, W.D. 2012. Structural biology of the intrinsic cell death pathway: what do we know and what is missing? *Computational and Structural Biotechnology Journal* **1**(1).
- Lee, J., Lee, H.J., Shin, M.K., and Ryu, W.S. 2004. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. *Biotechniques* **36**(3): 398-400.
- Letai, A. 2009. Puma strikes Bax. *J Cell Biol* **185**(2): 189-191.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**(3): 183-192.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**(5): 443-450.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**(4): 463-477.

- Lewis, S., Bethell, S.S., Patel, S., Martinou, J.C., and Antonsson, B. 1998. Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax. *Protein Expr Purif* **13**(1): 120-126.
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., and Cook, S.J. 2003. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* **278**(21): 18811-18816.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**(4): 491-501.
- Lindsay, J., Esposti, M.D., and Gilmore, A.P. 2010. Bcl-2 proteins and mitochondria - specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta*.
- 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., and Thompson, C.B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1497-1508.
- Lipton, S.A. and Bossy-Wetzel, E. 2002. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* **111**(2): 147-150.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. 2003. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* **19**(3): 341-352.
- Lock, R.B. and Stribinskiene, L. 1996. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res* **56**(17): 4006-4012.
- Lomonosova, E. and Chinnadurai, G. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S2-19.
- Lopez-Royuela, N., Balsas, P., Galan-Malo, P., Anel, A., Marzo, I., and Naval, J. 2009. Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**(2): 311-322.
- . 2012. Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**(2): 311-322.
- Lopez-Royuela, N., Perez-Galan, P., Galan-Malo, P., Yuste, V.J., Anel, A., Susin, S.A., Naval, J., and Marzo, I. 2010. Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **79**(12): 1746-1758.
- Lopez, H., Zhang, L., George, N.M., Liu, X., Pang, X., Evans, J.J., Targy, N.M., and Luo, X. 2010. Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL

- interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage. *J Biol Chem* **285**(20): 15016-15026.
- Lorenzo, H.K. and Susin, S.A. 2004. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Lett* **557**(1-3): 14-20.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* **135**(6): 1074-1084.
- Luo, L. and O'Leary, D.D. 2005. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* **28**: 127-156.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**(4): 481-490.
- Luthi, A.U. and Martin, S.J. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**(4): 641-650.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* **44**(4): 517-531.
- Ma, C., Ying, C., Yuan, Z., Song, B., Li, D., Liu, Y., Lai, B., Li, W., Chen, R., Ching, Y.P., and Li, M. 2007. dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* **282**(42): 30901-30909.
- Madesh, M. and Hajnoczky, G. 2001. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* **155**(6): 1003-1015.
- Mahajan, N.P., Linder, K., Berry, G., Gordon, G.W., Heim, R., and Herman, B. 1998. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol* **16**(6): 547-552.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N.R. 2002. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(11): 3577-3589.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* **184**(3): 1155-1160.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Jonas, E.A., and Kinnally, K.W. 2005. The role of the mitochondrial apoptosis induced channel MAC in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr* **37**(3): 155-164.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Kinnally, M.S., Oh, K.J., Mannella, C.A., and Kinnally, K.W. 2009. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J Biol Chem* **284**(18): 12235-12245.

- Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. 1998a. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed Pharmacother* **52**(6): 248-251.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., and Kroemer, G. 1998a. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**(5385): 2027-2031.
- . 1998b. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**(5385): 2027-2031.
- Marzo, I. and Naval, J. 2008. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* **76**(8): 939-946.
- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. 1998b. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* **427**(2): 198-202.
- Matsuyama, S., Schendel, S.L., Xie, Z., and Reed, J.C. 1998. Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices. *J Biol Chem* **273**(47): 30995-31001.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. 2006. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* **21**(6): 749-760.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Krammer, P.H., and Peter, M.E. 1998. Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **273**(6): 3388-3393.
- Mei, Y., Du, W., Yang, Y., and Wu, M. 2005. Puma(\*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene* **24**(48): 7224-7237.
- Meijer, A.J. and Codogno, P. 2009. Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* **46**(4): 210-240.
- Merino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Bouillet, P. 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* **186**(3): 355-362.
- Michels, J., Johnson, P.W., and Packham, G. 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(2): 267-271.
- Miernyk, J.A. and Thelen, J.J. 2008. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J* **53**(4): 597-609.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E., and Saikumar, P. 2003. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* **278**(7): 5367-5376.
- Mizushima, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**(22): 2861-2873.

- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., and Gehring, K. 2006. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell* **24**(5): 677-688.
- Morell, M., Espargaro, A., Aviles, F.X., and Ventura, S. 2008. Study and selection of in vivo protein interactions by coupling bimolecular fluorescence complementation and flow cytometry. *Nat Protoc* **3**(1): 22-33.
- Morell, M., Ventura, S., and Aviles, F.X. 2009. Protein complementation assays: approaches for the in vivo analysis of protein interactions. *FEBS Lett* **583**(11): 1684-1691.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* **267**(5203): 1506-1510.
- Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M.K., and Grimm, S. 2003. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J* **17**(6): 696-698.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**(5): 2926-2930.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**(1): 87-90.
- Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**(5): 619-630.
- Nakagawa, C., Inahata, K., Nishimura, S., and Sugimoto, K. 2011. Improvement of a Venus-based bimolecular fluorescence complementation assay to visualize bFos-bJun interaction in living cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**(7): 1399-1401.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., and Youle, R.J. 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* **18**(9): 2330-2341.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., and Youle, R.J. 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* **153**(6): 1265-1276.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**: 863-917.
- Newmeyer, D.D. and Ferguson-Miller, S. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**(4): 481-490.
- Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**(11): 1028-1042.

- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**(8): 299-306.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. 2003. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* **17**(12): 1475-1486.
- Nouraini, S., Six, E., Matsuyama, S., Krajewski, S., and Reed, J.C. 2000. The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L). *Mol Cell Biol* **20**(5): 1604-1615.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* **17**(2): 384-395.
- O'Neill, J.W., Manion, M.K., Maguire, B., and Hockenbery, D.M. 2006. BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol* **356**(2): 367-381.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- Oh, K.J., Singh, P., Lee, K., Foss, K., Lee, S., Park, M., Aluvila, S., Kim, R.S., Symersky, J., and Walters, D.E. 2010. Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homooligomers. *J Biol Chem* **285**(37): 28924-28937.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**(10): 7743-7746.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. 2003. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**(6967): 671-676.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**(5280): 1392-1395.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 552-565.
- Ott, M., Norberg, E., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. 2009. Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ* **16**(8): 1075-1082.
- Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., and Brugge, J.S. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* **131**(5): 966-979.
- Ozoren, N. and El-Deiry, W.S. 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* **4**(6): 551-557.

- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M., and Green, D.R. 2005. The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 17975-17980.
- Pang, Y.P., Dai, H., Smith, A., Meng, X.W., Schneider, P.A., and Kaufmann, S.H. 2012. Bak Conformational Changes Induced by Ligand Binding: Insight into BH3 Domain Binding and Bak Homo-Oligomerization. *Sci Rep* **2**: 257.
- Parikh, N., Koshy, C., Dhayabaran, V., Perumalsamy, L.R., Sowdhamini, R., and Sarin, A. 2007. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein Bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic protein Bcl-xL. *BMC Cell Biol* **8**: 16.
- Parone, P.A., James, D.I., Da Cruz, S., Mattenberger, Y., Donze, O., Barja, F., and Martinou, J.C. 2006. Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**(20): 7397-7408.
- Pendergrass, W., Wolf, N., and Poot, M. 2004. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* **61**(2): 162-169.
- Perez-Galan, P., Roue, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., and Colomer, D. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* **107**(1): 257-264.
- Perkins, G., Bossy-Wetzel, E., and Ellisman, M.H. 2009. New insights into mitochondrial structure during cell death. *Exp Neurol* **218**(2): 183-192.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 83-94.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., and Paradies, G. 2003. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J* **17**(15): 2202-2208.
- Piehler, J. 2005. New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Curr Opin Struct Biol* **15**(1): 4-14.
- Pinon, J.D., Labi, V., Egle, A., and Villunger, A. 2008. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* **27** Suppl 1: S41-52.
- Ploner, C., Kofler, R., and Villunger, A. 2008. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene* **27** Suppl 1: S84-92.
- Polcic, P. and Forte, M. 2003. Response of yeast to the regulated expression of proteins in the Bcl-2 family. *Biochem J* **374**(Pt 2): 393-402.
- Poot, M., Zhang, Y.Z., Kramer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., and Haugland, R.P. 1996. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem* **44**(12): 1363-1372.
- Priault, M., Cartron, P.F., Camougrand, N., Antonsson, B., Vallette, F.M., and Manon, S. 2003. Investigation of the role of the C-terminus of Bax and of tc-Bid on Bax interaction with yeast mitochondria. *Cell Death Differ* **10**(9): 1068-1077.

- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**(3): 287-296.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. 2001. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**(5536): 1829-1832.
- Rapaport, D. 2003. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* **4**(10): 948-952.
- Rasola, A. and Bernardi, P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* **12**(5): 815-833.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J.M., Garrido, C., and Kroemer, G. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* **3**(9): 839-843.
- Rebois, R.V., Robitaille, M., Petrin, D., Zylbergold, P., Trieu, P., and Hebert, T.E. 2008. Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells. *Methods* **45**(3): 214-218.
- Reed, J.C. 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* **111**(7): 3322-3330.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* **5**(8): 733-740.
- Reid, B.G. and Flynn, G.C. 1997. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**(22): 6786-6791.
- Rekas, A., Alattia, J.R., Nagai, T., Miyawaki, A., and Ikura, M. 2002. Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. *J Biol Chem* **277**(52): 50573-50578.
- Ren, D., Tu, H.C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. 2010. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* **330**(6009): 1390-1393.
- Renault, T.T. and Manon, S. 2011. Bax: Addressed to kill. *Biochimie* **93**(9): 1379-1391.
- Ricci, M.S. and Zong, W.X. 2006. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* **11**(4): 342-357.
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. 2000. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* **14**(1): 23-27.

- Robida, A.M. and Kerppola, T.K. 2009. Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association. *J Mol Biol* **394**(3): 391-409.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**(24): 3179-3184.
- Roninson, I.B., Broude, E.V., and Chang, B.D. 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**(5): 303-313.
- Ruffolo, S.C. and Shore, G.C. 2003. BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* **278**(27): 25039-25045.
- Rupinder, S.K., Gurpreet, A.K., and Manjeet, S. 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* **46**(6): 383-393.
- Ryan, J.J., Prochownik, E., Gottlieb, C.A., Apel, I.J., Merino, R., Nunez, G., and Clarke, M.F. 1994. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5878-5882.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenberghe, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**(16): 2861-2874.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., and Schlesinger, P.H. 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**(8): 553-555.
- Saka, Y. and Smith, J.C. 2007. A mechanism for the sharp transition of morphogen gradient interpretation in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* **7**: 47.
- Sanz, C., Mellstrom, B., Link, W.A., Naranjo, J.R., and Fernandez-Luna, J.L. 2001. Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic Hrk gene in hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* **20**(9): 2286-2292.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., and Fesik, S.W. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**(5302): 983-986.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* **2**(12): 965-975.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**(6): 1675-1687.
- Scorrano, L. 2009. Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10): 1875-1883.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* **2**(1): 55-67.

- Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. 2009. Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol Biol Cell* **20**(8): 2276-2285.
- Schendel, S.L., Montal, M., and Reed, J.C. 1998. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* **5**(5): 372-380.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J.C. 1997. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5113-5118.
- Schinzl, A., Kaufmann, T., Schuler, M., Martinalbo, J., Grubb, D., and Borner, C. 2004. Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J Cell Biol* **164**(7): 1021-1032.
- Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. 1997. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11357-11362.
- Schmidt, C., Peng, B., Li, Z., Scwab, G.M., Fujioka, S., Niu, J., Schmidt-Supprian, M., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., and Chiao, P.J. 2003. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* **12**(5): 1287-1300.
- Schwarze, M.M. and Hawley, R.G. 1995. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* **55**(11): 2262-2265.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7834-7838.
- Setoguchi, K., Otera, H., and Mihara, K. 2006. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J* **25**(24): 5635-5647.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. 2010. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 508-520.
- . 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 508-520.
- Shen, H.M. and Codogno, P. 2010. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7**(5): 457-465.
- Sheridan, C. and Martin, S.J. 2010. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**(6): 640-648.
- Shibue, T. and Taniguchi, T. 2006. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* **119**(9): 2036-2043.
- Shoemaker, B.A. and Panchenko, A.R. 2007. Deciphering protein-protein interactions. Part I. Experimental techniques and databases. *PLoS Comput Biol* **3**(3): e42.

- Shyu, Y.J. and Hu, C.D. 2008. Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research. *Trends Biotechnol* **26**(11): 622-630.
- Shyu, Y.J., Liu, H., Deng, X., and Hu, C.D. 2006. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *Biotechniques* **40**(1): 61-66.
- Shyu, Y.J., Suarez, C.D., and Hu, C.D. 2008. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay. *Nat Protoc* **3**(11): 1693-1702.
- Smaili, S.S., Hsu, Y.T., Sanders, K.M., Russell, J.T., and Youle, R.J. 2001. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ* **8**(9): 909-920.
- Smith, A.J., Dai, H., Correia, C., Takahashi, R., Lee, S.H., Schmitz, I., and Kaufmann, S.H. 2011. Noxa/Bcl-2 protein interactions contribute to bortezomib resistance in human lymphoid cells. *J Biol Chem* **286**(20): 17682-17692.
- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D.E. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14376-14381.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**(7): 949-957.
- Srinivasula, S.M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**(34): 31469-31472.
- Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M., and Mosser, D.D. 2005. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**(46): 38729-38739.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V., and Salvesen, G.S. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**(5): 3149-3157.
- Strasser, A. 2005. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**(3): 189-200.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245.
- Sugioka, R., Shimizu, S., Funatsu, T., Tamagawa, H., Sawa, Y., Kawakami, T., and Tsujimoto, Y. 2003. BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene* **22**(52): 8432-8440.
- Sundararajan, R., Cuconati, A., Nelson, D., and White, E. 2001. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J Biol Chem* **276**(48): 45120-45127.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett,

- D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-446.
- Sutton, V.R., Davis, J.E., Cancilla, M., Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Sedelies, K., Browne, K.A., and Trapani, J.A. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* **192**(10): 1403-1414.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4): 645-654.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3): 613-621.
- Tafari, M., Cohn, J.A., Karpnich, N.O., Rothman, R.J., Russo, M.A., and Farber, J.L. 2002. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* **277**(51): 49569-49576.
- Tait, S.W. and Green, D.R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-632.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., and Wong, W.W. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**(15): 9677-9682.
- Tan, C., Dlugosz, P.J., Peng, J., Zhang, Z., Lapolla, S.M., Plafker, S.M., Andrews, D.W., and Lin, J. 2006. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* **281**(21): 14764-14775.
- Tan, M.L., Ooi, J.P., Ismail, N., Moad, A.I., and Muhammad, T.S. 2009. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res* **26**(7): 1547-1560.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 231-241.
- Terrones, O., Etxebarria, A., Landajuela, A., Landeta, O., Antonsson, B., and Basanez, G. 2008. BIM and tBID are not mechanistically equivalent when assisting BAX to permeabilize bilayer membranes. *J Biol Chem* **283**(12): 7790-7803.
- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. 2010. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* **584**(14): 2981-2989.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**(5381): 1312-1316.
- Thuduppathy, G.R., Terrones, O., Craig, J.W., Basanez, G., and Hill, R.B. 2006. The N-terminal domain of Bcl-xL reversibly binds membranes in a pH-dependent manner. *Biochemistry* **45**(48): 14533-14542.

- Tremblais, K., Oliver, L., Juin, P., Le Cabellec, T.M., Meflah, K., and Vallette, F.M. 1999. The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochem Biophys Res Commun* **260**(3): 582-591.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.
- Uren, R.T., Dewson, G., Chen, L., Coyne, S.C., Huang, D.C., Adams, J.M., and Kluck, R.M. 2007. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol* **177**(2): 277-287.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schagger, H., Rustin, P., and Kroemer, G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* **23**(23): 4679-4689.
- Valentijn, A.J., Metcalfe, A.D., Kott, J., Streuli, C.H., and Gilmore, A.P. 2003. Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol* **162**(4): 599-612.
- Valentijn, A.J., Upton, J.P., Bates, N., and Gilmore, A.P. 2008. Bax targeting to mitochondria occurs via both tail anchor-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Differ* **15**(8): 1243-1254.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. 2008. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* **15**(3): 453-460.
- Vaux, D.L. 2011. Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 546-550.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**(1): 43-53.
- Vidi, P.A., Przybyla, J.A., Hu, C.D., and Watts, V.J. 2010. Visualization of G protein-coupled receptor (GPCR) interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**: Unit 5 29.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**(5647): 1036-1038.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(6): 385-392.
- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**(6658): 350-351.
- Walensky, L.D. and Gavathiotis, E. 2011. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci* **36**(12): 642-652.

- Walensky, L.D., Kung, A.L., Escher, I., Malia, T.J., Barbuto, S., Wright, R.D., Wagner, G., Verdine, G.L., and Korsmeyer, S.J. 2004. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* **305**(5689): 1466-1470.
- Walensky, L.D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K.J., Barbuto, S., Fisher, J., Smith, E., Verdine, G.L., and Korsmeyer, S.J. 2006. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell* **24**(2): 199-210.
- Wang, H., Takemoto, C., Akasaka, R., Uchikubo-Kamo, T., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Sugano, S., Tanaka, A., Inoue, M., Kigawa, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. 2009. Novel dimerization mode of the human Bcl-2 family protein Bak, a mitochondrial apoptosis regulator. *J Struct Biol* **166**(1): 32-37.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. 1999. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**(5412): 339-343.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. 1996. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* **10**(22): 2859-2869.
- Wasilewski, M. and Scorrano, L. 2009. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol Metab* **20**(6): 287-294.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**(16): 2060-2071.
- 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., and Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-730.
- Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., and Tang, H. 2005. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem* **280**(11): 10491-10500.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 521-531.
- . 2010. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 521-531.
- Wilfling, F., Weber, A., Potthoff, S., Vogtle, F.N., Meisinger, C., Paschen, S.A., and Hacker, G. 2012. BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death Differ* **19**(8): 1328-1336.
- Willis, S., Day, C.L., Hinds, M.G., and Huang, D.C. 2003. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4053-4056.
- Willis, S.N. and Adams, J.M. 2005a. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 617-625.

- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M., and Huang, D.C. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**(5813): 856-859.
- Wolff, J.A. and Budker, V. 2005. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* **54**: 3-20.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**(5): 1281-1292.
- Wu, W., Liu, P., and Li, J. 2012. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* **82**(3): 249-258.
- Xu, Y., Kanauchi, A., von Arnim, A.G., Piston, D.W., and Johnson, C.H. 2003. Bioluminescence resonance energy transfer: monitoring protein-protein interactions in living cells. *Methods Enzymol* **360**: 289-301.
- Xue, L.Y., Chiu, S.M., and Oleinick, N.L. 2005. Differential responses of Mcl-1 in photosensitized epithelial vs lymphoid-derived human cancer cells. *Oncogene* **24**(46): 6987-6992.
- Yee, K.S. and Vousden, K.H. 2008. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis* **13**(1): 87-95.
- Yethon, J.A., Epand, R.F., Leber, B., Epand, R.M., and Andrews, D.W. 2003. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem* **278**(49): 48935-48941.
- Yip, K.W. and Reed, J.C. 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**(50): 6398-6406.
- Yivgi-Ohana, N., Eifer, M., Addadi, Y., Neeman, M., and Gross, A. 2011. Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis. *Cell Death Dis* **2**: e166.
- Youle, R.J. and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.
- Yu, J. and Zhang, L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27** **Suppl 1**: S71-83.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**(3): 673-682.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182**(2): 367-377.

- Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T., and Reed, J.C. 1996. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* **271**(13): 7440-7444.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**(5497): 1761-1765.
- Zhang, L., Lopez, H., George, N.M., Liu, X., Pang, X., and Luo, X. 2011. Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ* **18**(5): 864-873.
- Zhang, L., Shimizu, S., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Tsujimoto, Y. 2004. A caspase-8-independent signaling pathway activated by Fas ligation leads to exposure of the Bak N terminus. *J Biol Chem* **279**(32): 33865-33874.
- Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., and He, Y.W. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* **15**(10): 749-769.
- Zhang, Z., Zhu, W., Lapolla, S.M., Miao, Y., Shao, Y., Falcone, M., Boreham, D., McFarlane, N., Ding, J., Johnson, A.E., Zhang, X.C., Andrews, D.W., and Lin, J. 2010. Bax forms an oligomer via separate, yet interdependent, surfaces. *J Biol Chem* **285**(23): 17614-17627.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. 2005. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**(7): 1085-1095.
- Zhou, F., Yang, Y., and Xing, D. 2010. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J* **278**(3): 403-413.
- Zhou, L. and Chang, D.C. 2008. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *J Cell Sci* **121**(Pt 13): 2186-2196.
- Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J., and Chittenden, T. 2000. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem* **275**(32): 25046-25051.
- Zhu, Y., Swanson, B.J., Wang, M., Hildeman, D.A., Schaefer, B.C., Liu, X., Suzuki, H., Mihara, K., Kappler, J., and Marrack, P. 2004. Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7681-7686.