

CAPÍTULO V

Mitocondria y apoptosis

■ José Miguel Ortiz Melón y Antonio Doadrio Villarejo

Académicos de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, 28040, Madrid, España. edicion@ranf.com

RESUMEN

La Mitocondria desempeña un papel clave en la activación de la apoptosis en las células de mamíferos. Los miembros de la familia de proteínas de Bcl-2 regulan la liberación de proteínas como Cit c del espacio situado entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria. Una vez en el citosol estas proteínas activan a las caspasas, un tipo de proteasas que son capaces de degradar y desmantelar el contenido celular. Dado que la apoptosis es un proceso conservado evolutivamente comparamos y contrastamos los procesos de apoptosis en mamíferos con los de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Aunque el papel central de la mitocondria en la apoptosis está bien establecida en mamíferos no está tan claro que la mitocondria desempeñe ese mismo papel en nematodos y moscas. También surge la cuestión de cuando, durante la evolución, la mitocondria pasó a desempeñar un papel tan esencial en el proceso de apoptosis. Dada la existencia de conservación funcional entre la proteína de *C. elegans*, ced-9, y la proteína Bcl-2 de mamíferos, resulta paradójico que proteínas homólogas de Bcl-2 en *Drosophila* no desempeñen asimismo un papel esencial en la inducción de apoptosis en la mosca.

INTRODUCCIÓN

La vida y la muerte no son solamente el objeto permanente de la filosofía, sino también, una difícil decisión, que nuestra maquinaria celular tiene que realizar en cada momento. Así, mientras que los organismos unicelulares sobreviven gracias a su rápida propagación, los organismos multicelulares han elaborado un complejo mecanismo para eliminar células dañadas, infectadas o simplemente no deseadas, de modo, que el conjunto pueda sobrevivir mejor. Esta muerte celular programada tiene patrones específicos tales como: contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, etc. y se denomina apoptosis (1). En las dos últimas décadas, se han llevado a cabo enormes progresos en el conocimiento de este proceso, no solo porque la apoptosis es un mecanismo esencial que gobierna la construcción del cuerpo, la homeostasis, la defensa frente a la infección y el estrés genotóxico, sino también, porque la desregulación de la apoptosis conduce al cáncer y a enfermedades de tipo inmunitario.

En el centro de la regulación de la apoptosis, se encuentra el proceso de la activación de caspasas, un grupo de cisteína-aspártico proteasas que pueden hidrolizar muchos sustratos celulares y que al hacerlo, desorganizan completamente a las células (2). Las caspasas, se encuentran en la célula como zimógenos inactivos o proenzimas. Durante la apoptosis, las procaspasas son hidrolizadas por proteólisis, generando una subunidad grande y otra pequeña. Los dos fragmentos son capaces de formar un heterotetrámero que es la forma activa del enzima. La activación de caspasas, es uno de los últimos sucesos en las rutas apoptóticas y el bloqueo de la actividad caspasa, suprime la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*. Por ello, la activación de caspasas se encuentra generalmente sometida a una regulación muy estricta.

Se conocen dos rutas apoptóticas principales llamadas ruta extrínseca e intrínseca. La ruta extrínseca, también denominada la ruta del receptor de muerte, es activada desde fuera de la célula por la unión de diferentes ligandos a receptores transmembrana (de muerte) como Fas, TNF, TRAIL y DR3-6 (Figura 1). La ruta intrínseca se denomina también ruta mitocondrial, debido al papel que en ella desempeña la mitocondria. Este papel es de dos tipos, por un lado, la mitocondria es el lugar donde proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas interaccionan, y por otro, la mitocondria es también el origen de señales que inician la actividad de caspasas a través de diversos mecanismos (Figura 2). Por ejemplo, el citocromo c (Cit. c) es un componente clave del complejo proteico apoptosoma que da lugar a la activación de la caspasa-9 o caspasa iniciadora. Tras su

liberación de la mitocondria, la proteína Smac y Omi se unen a inhibidores de la apoptosis (IAPs) y anulan sus efectos inhibitorios sobre la actividad caspasa. Estas proteínas mitocondriales llevan a cabo también otras funciones relacionadas con el crecimiento celular normal. En general, la separación espacial de las proteínas mitocondriales de sus dianas celulares, es un mecanismo de seguridad para prevenir una activación no deseada de la apoptosis en células sanas. Solo tras su liberación de la mitocondria, se convierten en letales.

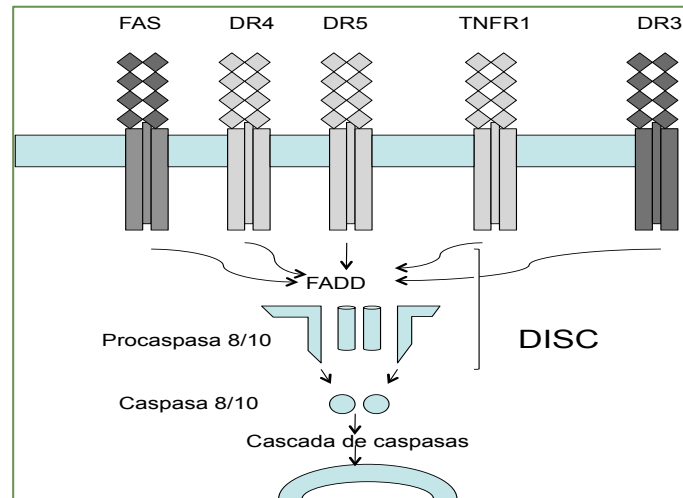


Figura 1.- La ruta extrínseca es activada desde el exterior celular por ligandos de receptores de muerte transmembrana como Fas, TNF, TRAIL y DR3-6. Tras la activación cada receptor forma un complejo de señalización (DISC) por reclutamiento de FADD y la procaspasas 8 y 10. Las caspasas 8 y 10 son activadas y a su vez activan a las caspasas efectoras.

Históricamente, Kerr y cols., en un trabajo pionero (1), describieron que la mitocondria parecía normal durante la apoptosis. Por ello, se pensó inicialmente, que la muerte celular estaba controlada a nivel nuclear. Sin embargo, pronto se encontró que, en la mayoría de los modelos de apoptosis, la transcripción y traducción no eran procesos necesarios. Además se encontró también que la apoptosis, podía tener lugar en células a las que se había privado de núcleo, lo que implicaba que la apoptosis debía de estar regulada a nivel citoplásmico. El primer dato de que la apoptosis podía estar regulada a nivel mitocondrial, procede de cuando se encontró que la proteína Bcl-2, una proteína oncogénica inhibidora de la apoptosis, se localizaba en la membrana mitocondrial (3) y que la

eliminación de su dominio C-terminal transmembrana reducía la capacidad de Bcl-2 para inhibir la apoptosis (4). Poco después, se encontró en extractos de huevos de *Xenopus* que contenían todos los componentes necesarios para el proceso de apoptosis, que una fracción mitocondrial del mismo, era esencial (5). Mas tarde, se halló también, que la permeabilidad mitocondrial debida a un complejo proteico que forma un poro era también un elemento necesario y se postuló el papel esencial de la mitocondria en la apoptosis (6). Por otra parte, mas o menos al mismo tiempo, se encontró que el Cit. c era necesario para la activación de caspasas (7) y que la liberación de Cit. c de la mitocondria era el proceso regulado por Bcl-2, estableciéndose así de una manera firme el papel que la mitocondria desempeña en la apoptosis (8).

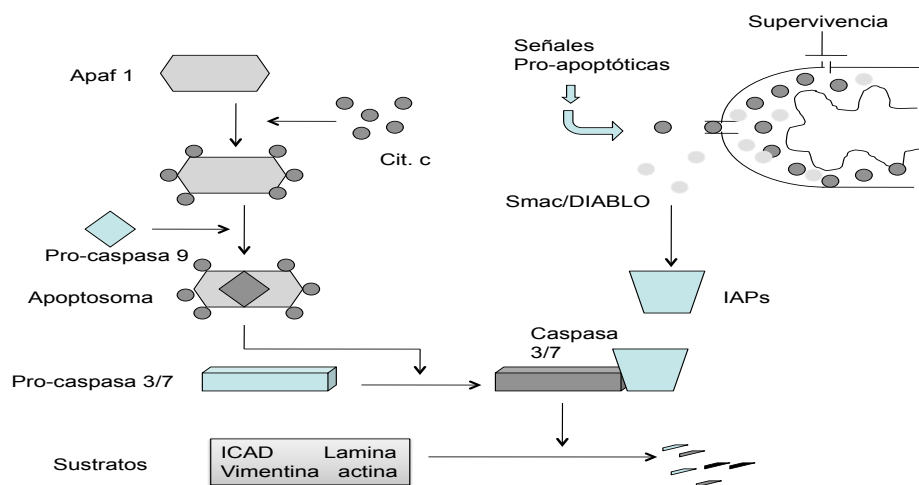


Figura 2.- Tras la activación de proteínas proapoptóticas se produce la liberación de Cit. c, Smac/ DIABLO y otras proteínas no señaladas de la mitocondria. El Cit. c citosólico se une a Apaf-1 para inducir la formación del apoptosoma, un complejo de proteínas responsable de la activación de caspasas 9 y 3/7. Smac/DIABLO y otras proteínas no indicadas se unen a proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) revertiendo su efecto inhibitorio y permitiendo que las caspasas efectoras 3/7 lleven a cabo la proteólisis de una variedad de sustratos celulares.

REGULACIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL POR PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2

La ruta mitocondrial se activa en respuesta a estímulos de muerte, tales como lesiones en el DNA, agentes quimioterápicos, ayuno (agotamiento de suero) e irradiación UV. En algunos tipos celulares, la llamada ruta extrínseca que se inicia por la interacción de ligandos con el receptor de muerte Fas, puede comunicarse con la ruta intrínseca a través de la hidrólisis de la proteína Bid mediada por la caspasa-8 lo cual da lugar a una proteína truncada tBid que se transloca a la mitocondria y dispara la liberación de Cit. C (9).

Tras el descubrimiento de que la función antiapoptótica de Bcl-2 era bloquear la liberación de Cit. c la cuestión sin resolver era cómo actuaba Bcl-2 a nivel molecular. Hay que recordar a este respecto, que Bcl-2 es miembro de una amplia familia de proteínas que pueden ser divididas en dos clases: proteínas anti-apoptóticas entre las que se encuentran además de Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Bcl-Rambo, Bcl-L10 y Bcl-, y otras, como Bax, Bak, y Bok que son proteínas pro-apoptóticas. Otro grupo más heterogéneo, está constituido por proteínas que comparten el motivo BH3 y que se denominan proteínas de la familia BH3. Entre ellas se encuentran proteínas como Puma, Noxa, Bid, Bad, Bim, Bik, Hrk y Bmf, las cuales se unen a e inhiben a las de la familia de Bcl-2 y por tanto son también proteínas pro-apoptóticas (10).

El papel de Bax/Bak en la inducción de la apoptosis se ha podido poner de manifiesto por el comportamiento de ratones generados por doble knockout *bax*^{-/-} *bak*^{-/-} los cuales son resistentes a una variedad de estímulos apoptóticos (11). Esto parece ser debido a que las proteínas denominadas “BH3-only” y las antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, son en realidad reguladores positivos y negativos de Bax/Bak respectivamente. De este modo, ni la activación de proteínas “BH3-only” ni la supresión de proteínas del tipo de Bcl-2 son suficientes para matar las células en ausencia de Bax y Bak (12) lo que sugiere que Bax/Bak son dianas reguladoras en las que convergen muchas señales intracelulares y determinan por tanto el destino de la célula.

En células sanas Bax se localiza en el citosol como un monómero. Durante la apoptosis, Bax se transloca a la mitocondria (13) y lleva a cabo cambios conformacionales que dan lugar a la formación de oligómeros que aparecen como focos en las mitocondrias. Por el contrario, Bak reside siempre en la mitocondria pero también oligomeriza durante la apoptosis. Así pues, la translocación de Bax y la liberación de Cit. c son considerados como

dos sucesos moleculares claves en la apoptosis. Se han propuesto dos modelos diferentes para explicar como las proteínas “BH3-only” activan a Bax/Bak. Según el modelo de activación directa Bax/Bak pueden ser activadas directamente por Bim, Bid y Puma o por otras proteínas “BH3-only” a través de la liberación de su asociación con proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. El modelo indirecto propone que Bax/Bak se activa cuando la proteínas anti-apotóticas de la familia de Bcl-2 se unen a proteínas “BH3 only”. Aunque hay evidencias a favor de ambos modelos lo interesante es que ambos se basan en las interacciones directas entre los tres grupos de proteínas. Un aspecto importante a considerar también, es la evidencia que indica la necesidad de un “ambiente lipídico” para las interacciones efectivas entre estas proteínas (14). Así pues en un modelo de consenso, se propugna que Bax/Bak pasan por un proceso de múltiples cambios conformacionales, asumiendo una conformación final necesaria para la permeabilización de la membrana. En este sentido, un lípido específico de la mitocondria, la cardiolipina, proporcionaría la especificidad para la localización de tBid en la mitocondria.

Desde un principio, se pensó, que la permeabilidad de la membrana mitocondrial podría originarse a partir de un rápido incremento de la permeabilidad de la membrana interna debido a la apertura de un poro. Este poro estaría formado por un complejo multiproteico en el sitio de contacto entre las membranas interna y externa. La composición molecular del poro no se conoce bien pero varias proteínas han sido ya identificadas como componentes del poro como son: hexoquinasa, la proteína VDAC, la adenina nucleótido translocasa (ANT) y ciclofilina D (CypD, una peptidil-prolil isomerasa). La apertura del poro conduciría a un hinchamiento de la matriz mitocondrial, despolarización del potencial de membrana, rotura de la membrana externa y liberación de proteínas del espacio intermembrana (8).

La estructura 3D de las proteínas de la familia de Bcl-2 (como Bcl-xL y Bax) recuerda a la de las toxinas bacterianas que son capaces de producir orificios en membranas para matar a las células infectadas (15). En resumen, el consenso actual indica que la oligomerización de Bax es necesario, para la liberación de Cit. c. Por otra parte e independientemente de la naturaleza de la permeabilidad, una serie de proteínas son liberadas de la mitocondria durante la apoptosis y este proceso es un factor esencial para la ejecución del proceso de apoptosis.

CITOCROMO C

El citocromo c es un componente esencial de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Es sintetizado como apo-citocromo c en los ribosomas y posteriormente se trasloca al espacio intermembrana. Una vez dentro, se le añade el grupo hemo formando el hemocitocromo c. El grupo prostético hemo actúa como un intermediario redox intercambiando electrones entre el complejo III (cyt b-c1) y el complejo IV (Cit. c oxidasa). Cuando se sugirió que la mitocondria era un elemento esencial en la apoptosis (5) no se esperaba que el Cit. c fuera a desempeñar un papel tan importante, hasta que se identificó como uno de los tres factores críticos para la activación de caspasas. Por otra parte, este hallazgo condujo a la idea de que también otras proteínas intermembrana, podían ser también liberadas por la mitocondria durante la apoptosis.

El papel de Cit. c en apoptosis está en la actualidad bien establecido tanto bioquímica como genéticamente. Por un lado Cit. c purificado es capaz de activar caspasas en extractos “in vitro” de células no apoptóticas (7). Por otro lado, se ha podido reconstruir la actividad del apoptosoma, un complejo proteico, a partir de Cit. c recombinante, Apaf-1 y caspasa-9 en presencia de ATP/dATP. Genéticamente, los ratones deficientes en Cit. c no llegan a completar su desarrollo (son embrionario letales), debido, a que Cit. c es indispensable para la cadena electrónica mitocondrial. Sin embargo los fibroblastos embrionarios (MEFs) muestran resistencia a una variedad de estímulos apoptóticos. Recientemente se ha conseguido un modelo de ratón knock-in, Cit. c K72A (16), en el que la mutación es capaz de eliminar la interacción de Cyt-c con su receptor Apaf-1, y en este modelo animal, la actividad caspasa-3 se encuentra reducida más de 10 veces “in vitro” pero permanece funcional en el intercambio de electrones en la cadena respiratoria. Estos ratones presentan defectos embrionarios que recuerdan mucho a los de los ratones deficientes *apaf-1*^{-/-} y *casp9*^{-/-} lo que indicaría que Cit. c actúa en la misma ruta. En este modelo, la función respiratoria es normal pero la activación de caspasa esta impedida y tampoco se observa oligomerización de Apaf-1 en respuesta a tratamiento con luz UV o estaurosporina.

Poco tiempo después de la identificación de la proteína Apaf-1, se encontró que Apaf-1 y Casp-9 formaban un gran complejo en presencia de Cit. c y dATP. Basado en la estructura cristalina de Apaf-1 y del complejo apoptosómico parece que la proteína Apaf-1 inactiva existe en una forma compacta y cerrada. La delección de un dominio WD40 da lugar a la unión y activación de caspasa-9 indicando que el monómero de Apaf-1 se encuentra en un estado autoinhibido. Tras la unión de Cit. c al dominio WD40 se produce

la conformación abierta. El ATP/dATP que se encuentra unido al dominio de unión de nucleótidos lleva a cabo su hidrólisis e induce cambios conformacionales que dan lugar a una forma cerrada menos flexible de Apaf-1. En esta nueva conformación Apaf-1 se une a otras seis subunidades formando una estructura simétrica en forma de rueda que constituye una plataforma para reclutar la procaspasa 9 y formar el apoptosoma activo.

Cit. c se encuentra pues en el centro de la activación de caspasa-9 mediada por Apaf-1 de manera que la regulación de la liberación de Cit. c es vital en la ruta intrínseca de la apoptosis. Dado que la mayoría del Cit. c reside dentro de unas típicas invaginaciones de la membrana interna las llamadas *crestas*, se ha especulado que la liberación de Cytc c se produciría en dos etapas: una primera etapa de movilización y otra de translocación, y que la movilización implicaría un remodelado de las *crestas*. Durante la movilización, Cit. c se desprendería de la membrana interna mitocondrial y se disociaría del fosfolípido de membrana, cardiolipina. No está muy claro cómo el Cit. c se desprende de la membrana interna, ni tampoco la importancia de la cardiolipina en la retención de Cit. c.

Desde hace algún tiempo, se apunta también a que la maquinaria de fisión mitocondrial, participa activamente en el proceso de apoptosis. Así, se pensó inicialmente, que las uniones entre las *crestas* se llegarían a ampliar para permitir el paso de Cit. c desde el espacio *inter-cresta* dado que el 85% de Cit. c se encuentra dentro de las crestas. Sin embargo esto no es necesario ya que el espacio entre crestas es suficiente para el paso de Cit. c. La anchura entre *crestas* está regulada por la proteína Opa 1 una proteína implicada en la fusión mitocondrial. Cuando la proteína Opa 1 se organiza en un complejo más grande, las uniones entre *crestas* son mayores y están cerradas. Por el contrario, cuando Opa1 se desorganiza, las uniones se hacen más estrechas pero se encuentran en un estado más abierto lo que permitiría el paso de Cit. c a la membrana externa. En apoyo de esta teoría un mutante de Opa1 protege a las células de la muerte celular al impedir la liberación de Cit. c (y de otras proteínas como Smac y Omi) sin afectar a la activación de Bax (17).

SMAC/DIABLO

La proteína Smac fue identificada por su capacidad para aumentar la actividad caspasa-3 mediada por Cit. c. Independientemente, otros investigadores identificaron la misma proteína que denominaron DIABLO. Aparentemente, Smac/DIABLO facilita la activación de caspasa por unión a la proteína XIAP y por tanto permite a las caspasas

(caspasa-9 y caspasa-3) eludir los efectos inhibidores de proteínas IAPs. Smac, compite con la caspasa-9 madura para interactuar con XIAP y como estas uniones se excluyen mutuamente, la unión de Smac con XIAP conduce a la liberación de caspasa 9 de la mordaza de XIAP. Por otra parte XIAP puede poliubiquitinar a ambas caspasa-9 y Smac indicando que la competencia que se establece entre estos factores puede decidir la muerte celular.

Se han descrito al menos tres variantes de Smac que se originan por splicing alternativo lo que sugiere una mayor complejidad en la función de Smac. Un resultado inesperado es que ratones KO para Smac presentan un fenotipo normal, lo que ha puesto en duda que Smac pueda tener un papel esencial en la apoptosis. Esto ha conducido a una re-evaluación de la función de Smac en el sentido de que podría tener otros papeles además de su interacción con proteínas tipo IAPs.

Como el Cit. c, la liberación de Smac es independiente de caspasas y ambas proteínas son liberadas en una ventana de tiempo de 5-6 min., pero diversos estímulos muestran que su liberación puede ser independiente.

Dada la evidencia que sugiere la existencia de un lazo de retroactivación de caspasas por abajo en la ruta, que funcionaría en casos de disfunción de la mitocondria, no es sorprendente que la sobreexpresión de Smac conduzca a muerte celular independiente de Bax y Bcl-xL con liberación de Cit. c en una etapa posterior de apoptosis.

OMI/HTRA2

Omi es una proteína identificada originalmente como el homólogo humano de la proteína bacteriana HtrA2 (high temperatura requirement A) que interacciona con Mxi2 (18). Mas tarde, HtrA2/Omi fue identificado independientemente por otros grupos, como una nueva proteína de unión a XIAP y por tanto como una proteína pro-apoptótica liberada por la mitocondria al citosol por tratamiento con tBid (19). La proteína Omi/HtrA2 es transportada a la mitocondria como una proteína precursora, con el N-terminal expuesto hacia la matriz mitocondrial y el C-terminal conteniendo un dominio proteasa en el espacio intermembrana. Un dominio intermembrana cerca del N- terminus dirige a Omi a la membrana interna seguido de un IBM que quedaría expuesto tras el procesamiento por una proteasa mitocondrial.

En consecuencia, se ha propuesto que a diferencia de Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 puede degradar irreversiblemente a IAP por su actividad proteasa, además de secuestrar IAPs por la unión al dominio IBM. Se ha descrito también que el “knockdown” de Omi conduce a resistencia de células a apoptosis mientras que su sobreexpresión aumenta la apoptosis. Ambos, la actividad proteasa y la actividad de unión a IAP son necesarias para la muerte celular. Los ratones mutantes deficientes en Omi/HtrA2 no muestran el fenotipo apoptótico esperado y por el contrario muestran una apoptosis excesiva.

La similitud estructural entre Omi y HtrA bacteriano sugiere que Omi podría actuar como un sensor de estrés en la mitocondria. Así, la pérdida de Omi podría conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas y a disfunción mitocondrial. Por ello el papel de Omi/HtrA2 en la mitocondria normal podría enmascarar su función apoptótica en los ratones mutantes dado que ambas funciones podrían contrarrestarse entre sí.

El papel de IAPs en la apoptosis de mamíferos se ha puesto en cuestión a consecuencia de estos datos. Así aunque Omi/HtrA2 puede unir y degradar cIAP1-2 y 3 y XIAP “in vitro”, XIAP parece ser el único inhibidor de caspasa 3-7 y 9. Así cualquier función apoptótica de Omi/HtrA2 dependería de lo que los IAPs contribuyen a la respuesta apoptótica global de las células consideradas.

ENDO G

El nombre de endonucleasa G deriva de su actividad nucleasa que produce roturas de cadena tanto en DNA como en RNA. Endo G pertenece a una gran familia de nucleasas de estructura bba-Me-finger no específicas. Ha sido estudiada bajo los nombres de DNA (RNA) 5'endonucleasa, nucleasa (NUC1) mitocondrial y endo- exonucleasa mitocondrial (20).

El interés por esta enzima ha venido del descubrimiento de que Endo G es liberada por la mitocondria para facilitar la degradación de la cromatina nuclear. La cuestión de cómo es liberada de la mitocondria y si esta liberación depende de la actividad caspasa está sometida a debate, pero todo indica que la liberación de endo G es distinta de la de Cit. c. Una vez liberada, la función de endo G no es dependiente de actividad caspasa. La sobreexpresión de endo G citosólica promueve la muerte celular caracterizada por

fragmentación del DNA nuclear. Los datos genéticos sin embargo, no apoyan que endoG tenga un papel esencial en la apoptosis.

AIF

El llamado apoptosis inducing factor (AIF) fue la segunda proteína encontrada que se liberaba de la mitocondria durante la apoptosis. AIF es una flavina-adenina dinucleótido (FAD) oxidorreductasa, pero ni su capacidad de binding a FAD, ni la actividad oxidorreductasa es necesaria para su función apoptótica (21).

AIF es una proteína de la membrana interna mitocondrial con su extremo N-terminal hacia la matriz y su porción C terminal en el espacio intermembranas. Durante la apoptosis, tiene lugar un procesamiento proteolítico que da lugar a AIF soluble. Algunos inhibidores de caspasas como z-VAD bloquean su liberación de la mitocondria tanto “in vivo” como “in vitro” pero cómo las caspasas intervienen en este proceso no es bien conocido. Tras su procesamiento, AIF es liberada de la mitocondria y mediante la presencia de un motivo NLS es translocada al núcleo donde interacciona con DNA y conduce a la condensación y posterior degradación de la cromatina en fragmentos de 50 kb. Se desconoce cómo AIF puede degradar el DNA ya que no contiene una actividad nucleasa. Una posibilidad es que pueda reclutar nucleasas del tipo de endo G.

Aunque AIF ha sido muy estudiada, el hecho de que desempeñe un papel esencial en la apoptosis en condiciones fisiológicas no está claro. Aunque los estudios “in vitro” así lo indican, células ES deficientes sugieren que el papel de AIF es principalmente el de mantener la respiración de la mitocondria a través de su actividad oxidorreductasa. Ratones “knockout” AIF^{-/-} indican que AIF es necesario para la supervivencia y respiración mitocondrial normal en neuronas pero dado el papel esencial de AIF en la función mitocondrial resulta difícil definir su papel en la apoptosis.

PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS DE INVERTEBRADOS

El hecho de que reguladores clave de la apoptosis como Bcl-2, Apaf-1 y caspasas estén conservados en casi todas las especies de metazoos hace razonable suponer, una conservación evolutiva de los mecanismos de muerte celular desde invertebrados a humanos. Un suceso común en todos los procesos de apoptosis conocidos, es la activación de caspasas, en el que la hidrólisis de una gran variedad de sustratos celulares, inicia una serie de procesos coordinados y destinados a dismantelar la estructura celular sin recurrir a procesos inflamatorios. No es sorprendente, que la maquinaria básica de la apoptosis, se haya hecho más elaborada y diversificada en mamíferos, en relación con el modelo animal de invertebrado como el del gusano *C. elegans*. Lo más sorprendente sin embargo, es que aparentemente la mitocondria no parece que sea necesaria en la activación de caspasas en invertebrados. Por un lado si el Cit. c juega o no un papel esencial es controvertido. Por otro, el papel de la mitocondria en la regulación de caspasas puede haber evolucionado separadamente en vertebrados.

C. ELEGANS

El análisis genético en este organismo ha permitido establecer una ruta lineal de apoptosis con las proteínas Egl-1, Ced-9, Ced-4 y Ced-3 como elementos principales en la ejecución de la muerte celular en nematodos. La muerte celular puede así bloquearse en este organismo en mutantes de pérdida de función *egl-1*, *ced-4* y *ced-3* o de ganancia de función en el caso del mutante *ced-9* (22). Como en el caso de mamíferos, la activación de caspasas (Ced-3) en gusanos, también implica la formación de apoptosoma aunque se trate de un complejo más simple, es decir, con menos componentes. Datos genéticos y bioquímicos permiten establecer un modelo para la activación de Ced-3. Así, una proteína relacionada débilmente con Apaf-1, Ced-4, se encuentra unida constantemente con el homólogo de Bcl-2, Ced-9. La señal apoptótica aumenta la expresión de Egl-1, una proteína de tipo “BH3-only “ que se une a Ced-9 para inducir cambios conformacionales de modo que Ced-9 se disocia de Ced-4. Los dímeros Ced-4 liberados forman un complejo tetramérico de Ced-4 que funciona como un apoptosoma que facilita la autoactivación de Ced-3 (Figura 5). Una diferencia importante con el modelo de mamíferos es la ausencia de un papel importante

para Cit. c en la activación de ced-3. Por un lado Ced-4 no contiene a diferencia de Apaf 1 el dominio WD40 que se ha demostrado como el sitio por el que Cit. c se une a Apaf 1. Este mismo dominio WD40 es responsable del mantenimiento de Apaf 1 en una forma autoinhibida. Por el contrario, en *C. elegans* Ced-4 se une a Ced-9 sólo para impedir su oligomerización y acceso a Ced-3. De hecho, la activación de Ced-3 tiene lugar sólo por la adición de Ced-4.

En relación con endo G, la proteína Cps-6 (Ced-3 protease supresor) es su homólogo. Se ha encontrado que un mutante *csp-6* presenta un defecto en la apoptosis que da lugar a un retraso en el proceso y que aumenta los fenotipos de mutantes *ced-3* y *ced-4*, sugiriendo un papel en la apoptosis pero menor. Sin embargo no se ha podido demostrar que sea liberado de la mitocondria durante la apoptosis. *C. elegans* también contiene un homólogo de AIF llamado Wah-1. Su silenciamiento por RNAi indica menor velocidad de crecimiento, menor tamaño y retraso en la aparición del llamado “cell corpse”. La proteína Wah1 puede cooperar con Csp-6 para degradar DNA y para inducir muerte celular. Es liberada de la mitocondria tras la inducción de EGL-1. También está implicada en la externalización de fosfatidilserina (PS) que es un marcador del proceso de apoptosis. En línea con esta función se ha observado también que AIF promueve la exposición de PS al exterior de la célula.

Todos estos datos no impiden señalar que hay poca evidencia para poder postular un papel esencial de la mitocondria en la inducción de apoptosis en *C. elegans*. Hay que tener en cuenta sin embargo, que la investigación en el modelo de *C. elegans* ha sido enfocada en relación con la muerte celular que tiene lugar en el desarrollo y que este proceso de apoptosis puede ser diferente de la apoptosis iniciada por estrés genotóxico o inducida por organismos patógenos. Otra consideración interesante es que *C. elegans* no presenta en su genoma proteínas del tipo de IAPs aunque sí tiene mecanismos de inhibición de caspasas. Debido a la ausencia de IAPs no es raro que no contengan tampoco proteínas homólogas de Smac o de Omi/Htr2A2.

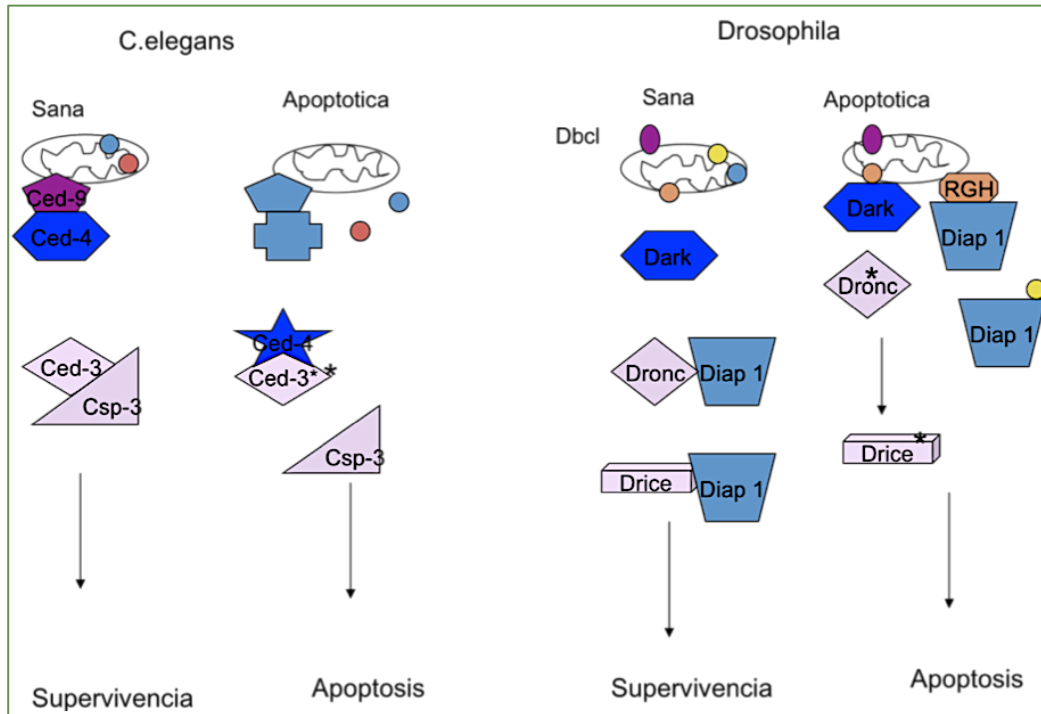


Figura 3.- En *C.elegans* Ced-4 está unida a Ced-9 en la membrana externa mitocondrial en células sanas. Ced-3 es reclutada por Csp-3, una caspasa homóloga para impedir su autoactivación. Egl-1, una proteína “BH3 only” es regulada transcripcionalmente en respuesta a estímulos apoptóticos. Egl-1 se une a Ced-9 para desplazar a Ced-4 que ahora puede formar un tetrámero y es capaz de activar a Ced-3 para iniciar la muerte celular. Csp-3 es desplazada por Ced-4 y su efecto sobre Ced-3 es eliminado.

En *Drosophila* las caspasas Dronc y Drice son ubiquitinadas por Diap-1 y degradadas en el proteosoma en células sanas. Tras la llegada de señales apoptóticas, los genes RHG se inducen y las proteínas se translocan a la mitocondria para reclutar a Diap1.

DROSOPHILA

En *Drosophila* la activación de caspasas constituye también la base de la regulación de la apoptosis (Figura 3). Tres genes denominados Reaper, Hid y Grim llamados colectivamente proteínas RHG interactúan con los IAPs de *Drosophila* (principalmente DIAP-1) y promueven la ubiquitinación y degradación de DIAP-1 impidiendo que esta proteína degrade a la caspasa iniciadora llamada Dronc (23). De acuerdo con ello, la deficiencia de DIAP-1 induce la activación de caspasa y la muerte celular. Estos datos podrían inducir a pensar que las caspasas de *Drosophila* no precisan de activación y que bastaría solamente su liberación de la unión a potentes inhibidores. Sin embargo en células sanas, la proteína Dark que es un homólogo de Apaf-1, es también necesaria, lo que indica la necesidad de una señal positiva además de la inhibición de IAPs.

Por su parte las proteínas Reaper y Hid del complejo RHG permeabilizan la mitocondria y liberan Cit. c en células S2. Análogamente las proteínas RHG se localizan asimismo en las mitocondrias de mamíferos y son capaces de liberar el Cit. c.

La búsqueda de un papel para Cit. c en la apoptosis de *Drosophila* se debe a la creencia en la existencia de un mecanismo conservado de apoptosis que implicaría la unión de Cit. c al homólogo de Apaf-1, la proteína Dark, que contiene también repeticiones WD40 en el C-terminal y que como se ha demostrado es el sitio de unión de Cit. c a Apaf-1 en mamíferos.

En ausencia de adición de dATP/ATP la incubación de Dark con Dronc da lugar a la formación del apoptosoma. Por todo ello, se puede considerar que hay una fuerte evidencia de la implicación de Cit. c en la activación de caspasa, en respuesta a una variedad de estímulos.

Es algo sorprendente en este contexto que existan solamente dos proteínas homólogas de Bcl-2 en *Drosophila* que son Debcl/Drob-1 y Buffy/dBorg-2. Los datos experimentales indican sin embargo que ambas proteínas no son esenciales para la inducción de apoptosis y que pueden en cambio ser reguladores. Resumiendo un conjunto de datos experimentales parece que los homólogos de Bcl-2 a través de su asociación con la mitocondria presentan una posibilidad potencial de estar implicadas en la apoptosis de la mosca pero que estas probablemente han evolucionado hacia una ruta que no requiere como elementos esenciales a las proteínas Bcl-2.

PERSPECTIVA

Una cuestión importante es si la mitocondria simplemente proporciona un ambiente de membrana que favorezca las interacciones proteína-proteína como es el caso de Bax y tBid en mamíferos. Otra cuestión de interés es cuando los vertebrados desarrollaron durante su evolución las rutas extrínseca e intrínseca. La respuesta a estas cuestiones ayudarían a entender mejor cómo actúan los miembros de la familia de Bcl-2 en la mitocondria y una hipótesis sería que regularan la fusión y fisión mitocondrial.

A pesar de que hace ya bastante que se descubrió el papel central de Cit. c en la ruta mitocondrial quedan cuestiones sin resolver en relación con su liberación.

La apoptosis es un proceso rápido. Estudiar la dinámica de las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana en células durante la muerte celular son la clave para entender los mecanismos que ayuden a entender los procesos de inducción y ejecución. La determinación de la naturaleza de los poros Bax/Bak y los mecanismos que subyacen en la traslocación de Bax son los dos procesos que quedan por entender. La respuesta a estas cuestiones puede facilitar el diseño de fármacos más efectivos para el cáncer y otras enfermedades relacionadas con la apoptosis.

ABREVIATURAS

VDAC	voltage dependent anion channel
Apaf-1	Apoptotic protease activator 1
ATP	adenosina trifosfato
KO	knock out
HtrA	high temperature requirement A
IBM	internal binding domain
AIF	apoptosis inducing factor
NLS	nuclear localization signal
ES	embryonic stem
PS	fosfatidil serina.
Cit. c	citocromo c
Bcl-2	B cell lymphoma 2

IAPs	Inhibidores de apoptosis
Smac	second mitochondria derived activator of caspase;
UV	ultravioleta

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972) *Br. J. Cancer*. 26: 239-257.
2. Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997) *Cell*. 91: 443-446.
3. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. (1990) *Nature*. 348: 334-336.
4. Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. (1993) *Cell*. 75: 241-251.
5. Newmeyer, D. D., Farschon, D. M. & Reed, J. C. (1994) *Cell*. 79: 353-364.
6. Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996) *J. Exp. Med.* 183: 1533-1544.
7. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996) *Cell*. 86: 147-157.
8. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. & Wang, X. (1997) *Science*. 275: 1129-1132.
9. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998) *Cell*. 94: 481-490.
10. Youle, R. J. & Strasser, A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 47-59.
11. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S. J. (2001) *Science*. 292: 727-730.
12. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R. & Thompson, C. B. (2001) *Genes Dev.* 15: 1481-1486.
13. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 3668-3672.
14. Chipuk, J. E. & Green, D. R. (2008) *Trends Cell. Biol.* 18: 157-164.
15. Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. & Fesik, S. W. (1996) *Nature*. 381: 335-341.
16. Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X. & Mak, T. W. (2005) *Cell*. 121: 579-591.
17. Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R. T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M. H. & Newmeyer, D. D. (2008) *Mol. Cell*. 31: 557-569.

18. Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J. V. & Zervos, A. S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 2581-2588.
19. van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2002) *Cell Death Differ.* 9: 20-26.
20. Low, R. L. (2003) *Mitochondrion.* 2: 225-236.
21. 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. & Kroemer, G. (1999) *Nature.* 397: 441-446.
22. Lettre, G. & Hengartner, M. O. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 97-108.
23. Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Muller, H. A. & Hay, B. A. (2002) *Nat. Cell Biol.* 4: 416-424.