

2-32-107

T/49

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE cGMP (PKG) Y DE LA c-Src TIROSINA QUINASA EN LA REGULACIÓN ANTAGÓNICA DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA APOPTOSIS

JUAN RIGOBERTO TEJEDO HUAMÁN

Tesis presentada para optar el grado de Doctor en Biología

SEVILLA – ESPAÑA

2000

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio... 186... número... 26... del libro
correspondiente.

10 OCT. 2000

Sevilla,

El Jefe del Negociado

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Dpto. Bioquímica Médica y Bid. Mol.
de la Facultad de Medicina
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de do

EL DIRECTOR DE



TELEF. 954 55 98 52 - 53 - 54

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 - SEVILLA

D. FRANCISCO JAVIER BEDOYA BERGUA, Profesor titular del
Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de
Medicina de la Universidad de Sevilla,

Certifica que:

D. JUAN RIGOBERTO TEJEDO HUAMÁN, ha realizado bajo mi dirección
la tesis titulada "PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE
cGMP (PKG) Y DE LA c-Src TIROSINA QUINASA EN LA REGULACIÓN
ANTAGÓNICA DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA APOPTOSIS" que
presenta para optar el grado de Doctor.

Sevilla, 02 de octubre de 2000

VºBº del Director

Dr. Francisco Javier Bedoya Bergua

El interesado

D. Juan R. Tejedo Huamán

A la memoria de mi hermana Natividad

Dedicado a Luis Alberto Tejedo Huamán, mi hermano mayor, por sus consejos, ejemplo, y la ayuda incondicional que me brindó durante mi formación profesional, sin ello nada de esto hubiera sido posible

A Gladys, apoyo permanente tanto en el laboratorio como en la casa.

A Rebeca fuente de alegrías y estímulos para seguir adelante

*A mis padres Eudomiro y Celia
A mis hermanos.*

AGRADECIMIENTOS

A lo largo del desarrollo de esta Tesis he recibido apoyo de personas e instituciones a las que quiero agradecer.

En primer lugar quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Francisco J. Bedoya Bergua, quien me ha dirigido en el desarrollo de este trabajo. Quiero dejar constancia de su acertada dirección académica y de su actitud positiva como persona. También quiero resaltar su gran interés por el desarrollo de la ciencia utilizando modelos de estudio y por la formación científica del personal a su cargo poniendo énfasis en la rigurosa interpretación de los experimentos. Es indudable que esta tesis, en gran medida, es la proyección intelectual de sus inquietudes.

Al Dr. Francisco Sobrino por el apoyo que me brindó a lo largo de mi estancia en Sevilla y a todos los profesores del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular por sus consejos y por conseguir hacer de mi estancia en el Departamento una experiencia fructífera.

A todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular por su amistad y compañía en los buenos y malos momentos que hemos compartido.

Al Programa de Becas Mutis de la Agencia Española de Cooperación Internacional que me otorgó una Beca para realizar los estudios de doctorado y el trabajo de tesis doctoral.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna-Perú, mi centro de trabajo que me otorgó la licencia para que pueda realizar este trabajo

En las actuales circunstancias en que mi querido Perú vive una de las peores crisis de su historia quiero recordar lo que escribió Basadre, y que tengamos presente que sólo nosotros con nuestra actitud construiremos una patria grande.

“Los tres grandes enemigos del porvenir del Perú son los podridos, los congelados y los incendiarios”

Los Podridos, han prostituido y prostituyen las palabras, conceptos, hechos e instituciones al servicio de sus medros, de sus granjerías, de sus instintos y de sus apasionamientos. Los congelados se han encerrado dentro de ellos mismos, no miran sino a quienes son sus iguales y a quienes son sus dependientes, considerando que nada más existe. Los incendiados se queman sin iluminar, se agitan sin construir. Los podridos han hecho y hacen todo lo posible para que el Perú sea una charca; los congelados lo ven como un páramo; y los incendiados quisieran prender explosivos y verter venenos para que surja una gigantesca fogata. Toda la clave del futuro está allí: que el Perú escape del peligro de no ser sino una charca, de volverse un páramo o de convertirse en una gigantesca fogata. Que el Perú no se pierda por la obra o la inacción de los peruanos

Jorge Basadre Grohmann

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

53BP-2	Proteína de unión a la p53
Akt/Pkb	Proteína quinasa B
ANT	proteína transportadora de nucleótidos de adenina
Apaf-1	Factor activador de apoptosis 1
APS	Persulfato de amonio
BAG-1	Chaperona reguladora de Hsp70,
Bcl-2	Familia de proteínas reguladoras de apoptosis
BH1, BH2, BH3 y BH4	Dominios BH (Bcl-2 homology),
BMK1	Gran proteína quinasa activada por mitogenos 1
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CASPASAS	Cisteína proteasas específicas de aspartato
CsA	Ciclosporina A
Csk	Quinasa celular de Src
c-Src	Tirosina quinasa no receptor
CyP-D	Ciclofilina D
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DETA/NO	Nanoato donador continuo de NO
DEVD↓G	Motivo de corte de la caspasa 3
DEVD-AFC	Sustrato fluorogénico de la caspasa 3
DISC	Complejo de iniciación de la señal de muerte
DR3	Receptor de muerte 3 (Apo 3, WSL-1, TRAMP, LARD)
DR4/DR5	Receptores de muerte 4/5 (Apo 2, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER)
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia aumentada
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FADD	Proteína adaptadora del receptor FAS con dominio de muerte
FAS	Apo 1, Receptor de muerte por apoptosis, producto del gen <i>fas</i>
FAS_L	Ligando de FAS
FLIP	Proteína inhibidora de ICE similar a FADD (FLICE, MACH α 1)
G –BPDEtide	Péptido sustrato específico de la PKG

GFP	Proteína verde fluorescente
GSNO	Nitrosotiol donador de NO
IAP	Proteínas inhibidoras de apoptosis
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
ICE	Enzima convertidora de la IL-1 β
INF-γ	Interferón-gamma
IRF-1	Factor regulador del interferón 1
JUN-1	Janus quinasa
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LPS	Lipolisacárido
MAP quinasa	Proteína quinasa activada por mitógenos
ME	Membrana mitocondrial externa
MI	Membrana mitocondrial interna
mtNOS	Óxido Nítrico Sintasa mitocondrial
MTT	Sal de tetrazolium
NADH	Nucleótido de adenina y nicotinamida reducido
NF-AT	Factor de transcripción
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
NO	Óxido Nítrico
NOS 1 (ncNOS)	Óxido Nítrico Sintasa constitutiva que se expresa en células neuronales
NOS 2 (iNOS, macNOS)	Óxido Nítrico Sintasa inducible
NOS 3 (ecNOS)	Óxido Nítrico Sintasa constitutiva que se expresa en células endoteliales
PAO	Óxido de fenilarsina
PARP	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PI3-quinasa	Fosfoinositol 3 fosfato quinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa dependiente de cGMP
PrP	Proteína prión

PT	Poros responsable de la permeabilidad transitoria de la mitocondria
Raf-1	Quinasa activada por RAS
RAIDD	Proteína adaptadora
RIA	Radio inmunoanálisis
RIP	Proteína modificadora que interacción con receptor
RNAasa A	Ribonucleasa A
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida
sGC	Guanilato Ciclasa soluble
SH	Dominios de homología a Src
SIN-1	3-morfolinosidnonimine
SNAP	S-nitroso-N-acetil-D,L,penicilamina
SNP	Nitroprusiato de sodio
STAT-1	Factor transductor de señales y activador de la transcripción –1
TBE	Tampón Tris-EDTA-Ácido Bórico
TBS	Tampón Tris-salino
TBST	Tampón Tris- salino más 0.1% de Tween 20
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TM	Dominio transmembrana
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor de TNF 1
TRADD	Proteína adaptadora del receptor TNFR con dominio de muerte
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
WD40	Secuencias repetidas en el extremo C-terminal de Apaf-1
YVAD-AFC	Sustrato fluorogénico de la caspasa 1
Z-VAD-CHO	Inhibidor general de caspasas
Z-YVAD-CHO	Inhibidor de caspasa 1
$\Delta\Psi$	Gradiente electroquímico

ÍNDICE DE MATERIAS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. <i>Muerte celular programada (MCP)</i>	3
2.2. <i>Las caspasas</i>	5
2.2.1. Blancos celulares de las caspasas	6
2.2.2. Estructura de las caspasas	8
2.2.3. Caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras	11
2.2.4. Regulación de la activación y actividad de las caspasas	11
2.3. <i>Proteínas de la Familia de Bcl-2</i>	16
2.3.1. Clasificación de las proteínas de la familia de Bcl-2	16
2.3.2. Mecanismos de acción de las proteínas de la familia de Bcl-2	17
2.3.3. Control de la acción de las proteínas de la familia de Bcl-2 por modificaciones postraduccionales	20
2.4. <i>Control mitocondrial de la apoptosis</i>	21
2.4.1. La mitocondria normal y la mitocondria durante la apoptosis	22
2.4.2. Control de la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria por proteínas de la familia de Bcl-2	23
2.5. <i>El Óxido Nítrico y el control de la apoptosis</i>	29
2.5.1. Formación de Óxido Nítrico	29
2.5.2. Señalización del Óxido Nítrico	30
2.5.3. Apoptosis inducida por el Óxido Nítrico	32
2.5.4. El Óxido Nítrico como protector de apoptosis	35
2.6. <i>La c-Src y el control de la apoptosis</i>	37
2.6.1. Estructura y regulación de la c-src	37
2.6.2. Las Src tirosina quinasas y la regulación de la apoptosis	40
2.7. <i>La proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG)</i>	41
3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1. <i>Material Biológico</i>	45
4.2. <i>Determinación de toxicidad celular</i>	45
4.2.1. Materiales	45
4.2.2. Procedimiento	45
4.3. <i>Medición de actividad metabólica</i>	46
4.3.1. Materiales	46
4.3.2. Procedimiento	47
4.4. <i>Medición de proteínas</i>	47
4.4.1. Materiales	47
4.4.2. Procedimiento	47

4.5.	<i>Medición de actividad de guanilato ciclasa soluble (sGC)</i>	48
4.5.1.	Materiales	48
4.5.2.	Obtención de homogeneizado crudo	48
4.5.3.	Determinación de la actividad de la sGC	48
4.5.4.	Determinación de GMPc por Radioinmunoanálisis (RIA)	49
4.6.	<i>Determinación de la actividad de proteína quinasa G (PKG)</i>	49
4.6.1.	Materiales	50
4.6.2.	Obtención de homogeneizado crudo	50
4.6.3.	Medición de la actividad de PKG	50
4.7.	<i>Medición de la actividad de caspasas</i>	51
4.7.1.	Materiales	51
4.7.2.	Preparación del homogeneizado	52
4.7.3.	Determinación de la actividad de caspasas	52
4.8.	<i>Medición de la fragmentación de ADN por el método de ELISA</i>	52
4.8.1.	Reactivos	53
4.8.2.	Procedimiento	53
4.8.3.	Cálculos	54
4.9.	<i>Determinación de la fragmentación de ADN en geles de agarosa</i>	54
4.9.1.	Materiales	54
4.9.2.	Obtención del ADN	55
	4.9.2.1. Recogida de células y lisis celular	55
	4.9.2.2. Extracción de ADN	55
	4.9.2.3. Índice de pureza y concentración de ADN	55
	4.9.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	56
4.10.	<i>Obtención y purificación de anticuerpos policlonales anti-citocromo c</i>	56
4.10.1.	Materiales	56
4.10.2.	Obtención	56
4.10.3.	Purificación	57
4.10.4.	Prueba de especificidad	57
4.11.	<i>Electroforesis de proteínas en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	58
4.11.1.	Materiales	58
4.11.2.	Preparación de los geles	58
4.11.3.	Condiciones de la electroforesis	59
4.12.	<i>Transferencia húmeda de las proteínas a membranas de PVDF</i>	59
4.12.1.	Materiales	59
4.12.2.	Procedimiento	60
4.13.	<i>Inmunodetección de proteínas por quimioluminiscencia (ECL)</i>	60
4.13.1.	Materiales	60

4.13.2. Procedimiento	60
4.14. Despegado de los anticuerpos primarios	61
4.14.1. Materiales	61
4.14.2. Procedimiento	61
4.15. Inmunodetección de citocromo c	61
4.15.1. Materiales	62
4.15.2. Obtención de la fracción citoplasmática libre de mitocondrias	62
4.15.3. Condiciones de la SDS-PAGE y la inmunodetección	62
4.16. Inmunodetección de Bcl-2	63
4.16.1. Materiales	63
4.16.2. Obtención del homogeneizado	63
4.16.3. Condiciones de la SDS-PAGE y la inmunodetección	63
4.17. Inmunodetección de fosfo-tirosina y c-Src	64
4.17.1. Materiales	64
4.17.2. Obtención de homogeneizado	64
4.17.3. Condiciones de la SDS_PAGE y la inmunodetección	64
4.18. Inmunoprecipitación de Bcl-2 y c-Src	65
4.18.1. Materiales	65
4.18.2. Inmunoprecipitación de Bcl-2	66
4.18.3. Inmunoprecipitación de c-Src	66
4.19. Estudios de fosforilación de Bcl-2	67
4.19.1. Materiales	67
4.19.2. Procedimiento	67
4.20. Estudios in vivo e in vitro de la actividad de c-Src tirosina quinasa	68
4.20.1. Materiales	68
4.20.2. Medición de la actividad quinasa de c-Src	68
4.20.3. Obtención de c-Src inactiva	68
4.20.4. Activación in vitro de la c-Src por el óxido nítrico	69
5. RESULTADOS	70
5.1. El óxido nítrico induce apoptosis en células RINm5F	70
5.1.1. Caracterización de la apoptosis inducida por el óxido nítrico	70
5.1.1.1. Fragmentación de ADN	71
5.1.1.2. Activación de caspasas	72
5.1.1.3. Salida de citocromo c	73
5.1.1.4. Degradación de Bcl-2	74
5.1.2. Papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por el NO	75
5.1.2.1. El efecto del NO sobre la actividad metabólica mitocondrial	75
5.1.2.2. El efecto del NO sobre la apertura del poro mitocondrial responsable de su permeabilidad transitoria (PT)	76

5.1.2.3.	El citocromo c participa en la cascada apoptótica inducida por el NO	78
5.1.3.	El óxido nítrico induce la actividad de la guanilato ciclasa soluble y de la proteína quinasa dependiente de GMPc	80
5.1.3.1.	Las células RINm5F presentan actividad de guanilato ciclasa soluble (sGC) y de proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), regulables por el NO	80
5.1.3.2.	Regulación de la apoptosis inducida por el NO en células RINm5F por el sistema sGC/PKG	82
5.2.	<i>El óxido nítrico a bajas concentraciones protege de la apoptosis en células RINm5F</i>	84
5.2.1.	La retirada de suero del medio de cultivo induce la apoptosis en células RINm5F	85
5.2.2.	El NO suprime el efecto de la retirada de suero del medio de cultivo sobre la viabilidad celular y la apoptosis en células RINm5F	86
5.2.3.	La retirada de suero del medio de cultivo desencadena la disminución de la actividad tirosina quinasa de la c-Src en células RINm5F	87
5.2.4.	El efecto anti-apoptótico del NO es dependiente de la activación de la c-Src en células RINm5F	89
5.2.5.	El efecto anti-apoptótico del NO es dependiente del sistema sGC/PKG en células RINm5F	90
5.2.6.	La actividad de la PKG es regulada por la c-Src en células RINm5F	91
6.	DISCUSIÓN	92
7.	CONCLUSIONES	98
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. RESUMEN

En los últimos años se han acumulado evidencias concernientes al papel de la apoptosis en el control de la población de células beta en la patogénesis de la IDDM. Así se ha visto que la apoptosis en células beta de roedores está mediada por la generación de óxido nítrico (NO) en un proceso regulado por citoquinas inflamatorias. Sin embargo respecto al papel del NO en el control de la apoptosis se han encontrado varios mecanismos por los que altas concentraciones de NO la inducen y bajas concentraciones la previenen.

En la primera parte de esta tesis mostramos que altas concentraciones de NO inducen la muerte celular por apoptosis en las células productoras de insulina RINm5F. Nuestros resultados indican que altas concentraciones de NO inducen la activación de acciones proapoptóticas como la fragmentación de ADN, activación de caspasa 3, liberación de citocromo c, y degradación de Bcl-2. Además induce la activación de acciones antiapoptóticas como la activación de la PKG. Debido a su mayor intensidad las acciones proapoptóticas predominan sobre las acciones antiapoptóticas. Las acciones proapoptóticas son independientes del sistema de señalización sGC/PKG, aun más nuestros resultados muestran que los índices apoptóticos aumentan de magnitud cuando en condiciones de apoptosis se inhibe la actividad de la PKG con el KT-5823, indicando que el NO activa a la PKG como parte de una respuesta anti-apoptótica. En estudios comparativos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando dadores de NO y el atracilósido encontramos que la regulación de la liberación de citocromo c por las mitocondrias es un elemento crítico en la apoptosis inducida por el NO y que dicha acción está relacionada con mecanismos dependientes de la apertura del poro de membrana responsable de la permeabilidad transitoria (PT) de la mitocondria.

En la segunda parte de esta tesis mostramos que la retirada de suero del medio de cultivo induce la muerte celular por apoptosis en células productoras de insulina RINm5F, la apoptosis fue seguida a través del estudio de índices como la liberación de citocromo c de la mitocondria, activación de caspasa 3, degradación de Bcl-2 y un nuevo índice llamado actividad de Bcl-2 quinasa, que consiste en determinar la capacidad que tienen los homogeneizados de fosforilar a Bcl-2 inmunoprecipitada. Nuestros resultados muestran por primera vez que bajas concentraciones de DETA/NO (10 μ M) inducen la reducción de la liberación de citocromo c, disminución de la activación de caspasa 3, prevención de la degradación de Bcl-2 y aumento de la actividad Bcl-2 quinasa; Estudios con inhibidores del sistema sGC/PKG, el ODQ y el KT 5823, revelan que estas acciones son dependientes de la activación de la sGC y de la PKG. El

DETA/NO induce la autofosforilación de la c-Src tanto *in vivo* como *in vitro* y la c-Src activa es capaz de inducir la fosforilación en tirosina de Bcl-2 *in vitro*. Debido a que la inhibición de la c-Src por el PP1 cancela las acciones del DETA/NO sobre la activación de la PKG, disminución de la activación de caspasas, disminución de la liberación de citocromo c de la mitocondria, prevención de la degradación de Bcl-2, e incremento de la actividad de Bcl-2 quinasa, proponemos que tanto la generación de cGMP y la activación de la c-Src son requeridos para la señalización de las acciones antiapoptóticas del NO sobre la mitocondria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo fisiológico para eliminar células superfluas o potencialmente peligrosas (1, 2). Durante el desarrollo de los animales, se producen muchas células que son innecesarias y la MCP juega un papel clave en la eliminación de estas células facilitando el desarrollo embrionario (3). Además, una regulación inapropiada de la MCP está implicada en la patogenia del cáncer, en el SIDA y en ciertas enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes (4, 5). En 1972 Kerr y col. (6) describieron los cambios morfológicos que caracterizan este tipo de muerte celular, tales como el encogimiento celular, la vesiculación de la membrana plasmática, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN en oligonucleosomas. Estos cambios contrastan con los observados durante la muerte celular provocada por sustancias tóxicas, daño o isquemia. En estas circunstancias, las células y los orgánulos tienden a hincharse y romperse en un proceso denominado necrosis. La Tabla 1 muestra las diferencias más destacables entre la MCP y la necrosis. A partir de estas observaciones se propuso que la célula tiene la capacidad de autodestruirse mediante la activación de un programa de suicidio celular intrínseco cuando ha sufrido un daño severo o durante el envejecimiento. Este proceso fisiológicamente normal Kerr y col. le denominaron "apoptosis" (6), término que fue tomado de la literatura griega clásica, donde se empleó para nombrar la caída estacional de las hojas y que etimológicamente significa "caer lejos". Posteriormente se acuñó el término Muerte Celular Programada (MCP) como sinónimo de apoptosis para indicar que este proceso ocurre tras la activación de una serie coordinada de procesos moleculares en la célula (7). Nosotros aquí utilizaremos indistintamente ambas acepciones.

Tabla 1. Características comparativas de la necrosis y la apoptosis

Necrosis	Muerte Celular Programada (Apoptosis)
Pérdida de la homeostasis celular	Inicialmente no se observan grandes cambios
Alteración de la permeabilidad de la membrana	No se observa inicialmente
Pérdida de potasio, entrada de sodio, fallos en el potencial de membrana	No hay flujo de sodio, no se observan cambios en la concentración de potasio en la célula.
Hinchamiento de los compartimentos citoplasmáticos	Condensación del citoplasma
Destrucción de la mitocondria y otros orgánulos	Generalmente los orgánulos permanecen intactos
	Se forman protuberancias en la superficie celular que se separan en forma de cuerpos apoptóticos.
Agotamiento de la energía celular (ATP)	No hay agotamiento de la energía celular
Disminución de la síntesis macromolecular	Es requerida la activación de la síntesis macromolecular
Afecta a todas las células contiguas	Afecta sólo a las células que recibieron el estímulo
Pérdida de los agregados de cromatina	Alta condensación de agregados granulares de cromatina
Atrofia pasiva	Degeneración activa

El papel de la MCP durante el desarrollo ha sido estudiado en detalle en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (8). En este organismo se ha mostrado que para que haya una adecuada eliminación de ciertas células durante el desarrollo de su sistema nervioso se requiere un grupo de genes llamados *ced-3* y *ced-4* (9, 10, 11). Por otra parte, se identificaron otros genes como el gen *ced-9* que actúan como protectores contra la muerte celular (12). Se ha demostrado que el producto del gen *ced-9* (Ced-9) inhibe la acción del producto del gen *ced-4* (Ced-4), lo que conlleva a la disminución de la actividad del producto del gen *ced-3* (Ced-3) (13), ya que Ced-4 promueve la activación de Ced-3 (14). Recientemente se ha encontrado en *C. elegans* que el producto del gen *egl-1* (Egl-1) promueve la MCP debido a que interacciona con Ced-9 rompiendo el complejo protector de la MCP formado por la asociación Ced-4-Ced-9 y por consiguiente promoviendo la activación de Ced-3 (15, 16, 17). El gen *ced-3* codifica una cisteína proteasa que es homóloga a la enzima convertidora de la IL-1 β (ICE), una cisteína proteasa de mamíferos (10). El gen *ced-9* codifica una proteína que es homóloga a la proteína Bcl-2 en mamíferos (18) y el gen *ced-4* codifica una proteína homóloga al factor activador de apoptosis (Apaf-1) de los mamíferos (19). Por último el gen *egl-1* codifica una proteína similar a las proteínas Bax y Bid de los mamíferos (20) En la Tabla 2 se muestran los productos de los genes *ced* y sus correspondientes homólogos en mamíferos y la función que cumplen.

Tabla 2. Relación entre las proteínas de *C. elegans* y sus correspondientes homólogos en mamíferos.

Proteínas de <i>C. elegans</i>	Proteínas de mamíferos	Función
Ced-3	Caspasas 8, 9, 10	Caspasas iniciadoras
Ced-4	Apaf-1, FADD, RAIDD, (c-FLIP _L)	Activadores de caspasas
Ced-9	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1	Proteínas antiapoptóticas homólogas de Bcl-2
Egl-1	Bax, Bak, Bok, Mtd, Bik/Nbk/Blk, Hrk/DP5, Bad, Bid, Bim/ Bod, NBIP3, NBIP3L	Proteínas proapoptóticas homólogas de Bcl-2 (proteínas BH3)

Tabla modificada de Núñez y col. (21)

Los trabajos con *C. elegans* revelan la importancia de una clase de cisteína proteasas, ahora llamadas caspasas (cysteinyll aspartate-specific proteinases) (22), para la MCP. Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, denominadas colectivamente procaspasas. Una meta importante en la investigación de la MCP es conocer los mecanismos reguladores de la activación de las caspasas en la MCP. Los estudios realizados en *C. elegans* han estado enfocados fundamentalmente hacia la identificación

de mecanismos de regulación de la apoptosis tomando como modelo las propias células que mueren por este proceso. Dichos estudios muestran que para ello se requiere la acción coordinada de al menos tres grupos de proteínas intracelulares, si bien un cuarto grupo de proteínas está implicado en la eliminación de las células muertas. Una consecuencia de este abordaje es la escasez de información relativa a su regulación por señales extracelulares. En cambio, en células de mamíferos se ha descrito que la iniciación de la MCP está cuidadosamente regulada por señales que pueden ser originadas en las propias células destinadas a morir o provenir de estímulos ambientales. Por ejemplo, el daño provocado en las células por radiaciones ionizantes, la infección por ciertos virus y la acción de señales externas de muerte y supervivencia. Dada esta variedad de factores que pueden afectar el destino de la célula, la fase ejecutora debe estar sometida a una regulación múltiple. La Figura 1 muestra que los mecanismos básicos de la apoptosis entre *C.elegans* y las células de mamíferos están altamente conservados

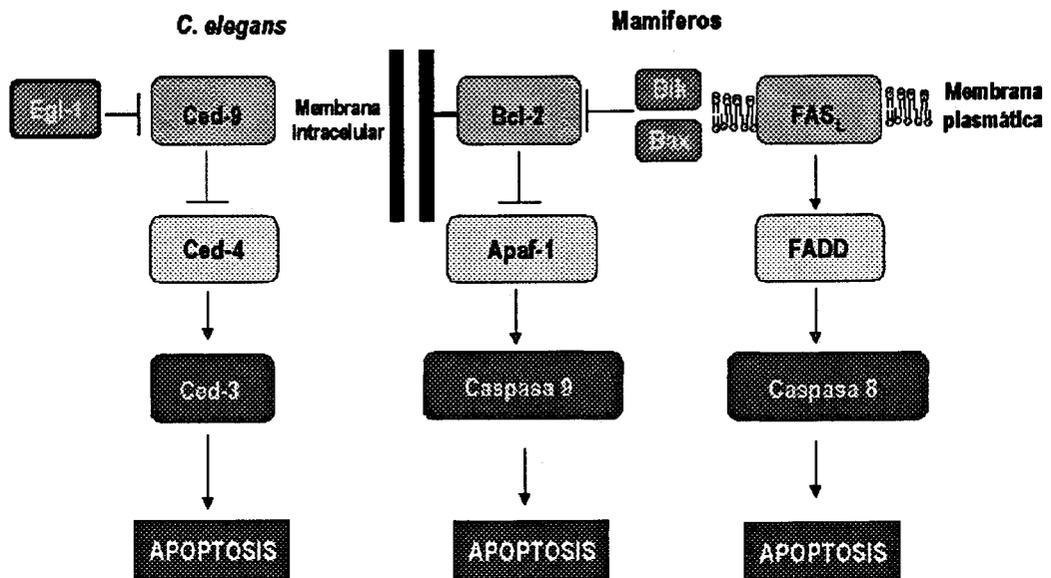


Figura 1. Comparación de las vías de muerte celular programada (MCP) en *Caenorhabditis elegans* y mamíferos. Los miembros de la familia Ced-9/Bcl-2 controlan tanto positiva como negativamente la MCP. La activación de Ced-4/Apaf-1 inicia la MCP y Ced-3 y las caspasas iniciadoras son mediadoras del proceso de muerte. En células de mamíferos además se ha descrito un proceso de apoptosis iniciada por la presencia de estímulos externos a través de proteínas adaptadoras (FADD) que activan a una caspasa iniciadoras.

2.2. LAS CASPASAS.

Hasta la fecha se han descrito 14 caspasas en mamíferos, 11 de las cuales se encuentran en humanos. Las propiedades de algunas de las caspasas se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades de algunas caspasas seleccionadas.

(Tabla modificada de Earnshaw y col.) (23)

Nombre nuevo, Nombre antiguo	Peso Molecular ^a			Sitio de procesamiento del zimógeno ^b	Péptidos sustratos preferidos ^c	Capacidad de autoproce- samiento ^d	Inhibición por ^e		
	Prodom	Grande	Pequeña				crmA	p35	XIAP
Caspasa 1 ICE	45	24 20	14 10	TPLD/S FEDD/A AVQD/N	YEVD↓X WEHD↓X	+	+++	+	-
Caspasa 2 Ich-IL NEDD2	48	32 18	14 12	DQQD/G EESD/A DNKD/G	VDVAD↓X DEHD↓X	+	-	+	-
Caspasa 3 CPP32	32	20 17	12	IETD/S —	DMQD↓X	+	-	+	+
ApopainA Caspasa 4 ICE _{relI}				ESMD/S WVRD/S LEED/A	DEVD↓X LEVD↓X (WL)EHD↓X	+		+	
Tx, Ich-2 Caspasa 5 ICE _{relIII} , Ty				? WVRD/S LEAD/S	— (WL)EDH↓X				
Caspasa 6	34	21 18	13 11	DVVD/N TEVD/A TETD/A	VEID↓N VEHD↓X	+	-	+	-
Caspasa 7 Mch3 CMH-1 ICE-LAP3	34	20	12	IQAD/S — DSVD/A	DEVD↓X DEVD↓X	+	-	+	+
Caspasa 8 Mch5 FLICE MACH	53 55	43 18	12 11	VETD/S LEMD/L REQD/S	IETD↓X LETD↓X	+	+	+	-
Caspasa 9 Mch6 ICE-LAP6	50	37 35 18	12 10	PEPD/A DQLD/A ?	— LEHD↓X	+			+
Caspasa 10 Mch4 FLICE-2	55	43 17	12	IEAD/A — SQTD/V	IEAD↓X	+		+	-
Caspasa 13 ERICE				? ? ?	— — —				

^a La aparición de múltiples entradas indica: procesamiento parcial, procesamiento completo de subunidad grande, procesamiento completo de subunidad pequeña que resultan de la degradación del final del C-terminal de la subunidad grande, seguido por la eliminación del péptido unión a partir de la subunidad pequeña y el predominio de la subunidad grande.

^b Para cada caspasa, la secuencia superior corresponde al sitio de ruptura activador inicial del C terminal de la subunidad grande, la secuencia del medio corresponde al sitio de ruptura que remueve la secuencia de unión entre la subunidad grande y la subunidad pequeña, y la secuencia de abajo corresponde a sitio de ruptura que elimina el predominio.

—, No se elimina secuencia de unión; ?, desconocido. Los sitios de ruptura han sido determinados por secuenciamiento de amino ácidos o mutaciones sitio dirigidas.

^c Para cada caspasa, la secuencia superior indica la preferencia de sustratos reportados por Talanian et al. (24), mientras que la secuencia de abajo indica la reportada por Thornberry et al. (25). —, no reportada.

^d +, tiene capacidad para autoprecesarse. En blanco, no reportado

^e +, si es inhibida, Blanco, no reportada.

2.2.1. Blancos celulares de las Caspasas

Las células inician la apoptosis después de desplegar una serie de cambios bioquímicos y morfológicos característicos tales como degradación del ADN, condensación de la cromatina, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cambios en la composición de la membrana citoplasmática y formación de cuerpos apoptóticos. Utilizando inhibidores de caspasas se ha determinado que las caspasas están relacionadas con estos cambios (revisado en 26). El papel de la caspasa 3 en estos procesos ha sido recientemente clarificado por los datos encontrados en ratones, en los que la función de caspasa 3 ha sido eliminada por ingeniería genética, observándose que en algunas células no se produce condensación de la cromatina o degradación del ADN mientras entran en apoptosis *in vitro* (27). El desmantelamiento de la estructura de la célula durante la fase de ejecución de la apoptosis es un proceso complejo que está íntimamente ligado a la ruptura de un gran número de sustratos celulares realizada por caspasas efectoras; por otro lado, las mismas caspasas efectoras pueden ser hidrolizadas por las caspasas iniciadoras. Los sustratos celulares según Earnshaw y col. (23) pueden ser divididos en los siguientes grupos: proteínas citoplasmáticas abundantes, proteínas nucleares abundantes, proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN, proteínas quinasas, otras proteínas involucradas en la transducción de señales, proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y la proliferación, proteínas involucradas en enfermedades humanas de origen genético, proteínas cuya ruptura juega un papel directo en la apoptosis. En la Tabla 4 se muestra un resumen de los sustratos de las caspasas, no se incluyen las caspasas efectoras sustrato.

Tabla 4. Proteínas sustratos de las caspasas durante la muerte celular programada

(Tomado de Earnshaw y col.) (23)			
Polipéptidos	Sitio de ruptura	Caspasa responsable	Efecto de la ruptura
Proteínas citoplasmáticas abundantes			
Gelsolin	DQTD/G	3	Ruptura de actina insensible a calcio
Gas-2	SRVD/G	?	Reordenamiento del citoesqueleto
Fodrina (Alfa II-espectrina)	DETD/S,DSL/D/S	3	Vesiculación de la membrana plasmática
Beta II-espectrina	DEVDIS	3	Desconocido
β -Catenina	?	3	↓ unión α -catenina y contacto célula-célula
Citoqueratina 18	VEVD/A	3,6,7	?
Proteínas nucleares abundantes			
Laminina A	VEID/N	6	Desmontaje de la lámina nuclear
Laminina B	VEVD/S	6, 7,3	Desmontaje de la lámina nuclear
NuMA	?	3,6	Cambios de la forma nuclear
Proteínas HnRNP C1 y C2	?	3	↓ del procesamiento de ARN
Proteína de 70 kDa de U1 snRNP	DGPD/G	3	↓ del procesamiento de ARN
Mdm2	DVPD/C	3,6,7	Desconocido
Proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN			
PARP	DEVD/G	3,7,9	↓ síntesis de poli(ADP-ribosa)
DNA-PKs	DEVD/N	3	En algunos estudios ↓ su actividad
Subunid. grande Factor replicación C	DEVD/G	3	Inhibe replicación fragmentos ADN N-terminal
Topoisomerasa	DDVD/Y	3	Desconocido
Proteínas quinasas			
PKC δ	DMQD/M	3	Quinasa constitutivamente activa
PKC ϵ , PKC-relacionada 2	DEVD/K,DITD/C	3	Quinasa constitutivamente activa
PKN	LGTD/S	3	Quinasa constitutivamente activa
PK IV Calcio/calmodulina dependiente	PAPD/A	3	Función desconocida
Quinasa 2 p21-activada	SHVD/A	3,8	Quinasa constitutivamente activa
PITSLRE quinasa α 2-1	YVPD/S	3	Quinasa constitutivamente activa
Mst 1 quinasa	DEMD/S	?	Quinasa constitutivamente activa
Mst2 quinasa	DELD/S	?	Quinasa constitutivamente activa
Quinasa de adhesión focal	DQTD/S	3,7	Pérdida de unión a paxilina, ↑ translocación al núcleo, ↓ actividad
MEKK-1	VSWD/S	6	↓ unión a 14-3-3, Cambios distribución celular, activación constitutiva
Wee 1 quinasa	?	3,7,8	Inactivación, inicia activación Cdk
Proteínas de la transducción de señales			
Pro-interleuquina-1 β	FEAD/G,YVHD/A	1	Elemento clave mediador de la inflamación
Pro-interleuquina-16	SSTD/S	3	Quimiotaxia del linfocito T
Pro-interleuquina-18	LESD/N	1	Induce síntesis del Interferon γ
Proteína GTPasa-activadora RAS	DTVD/G	3	Inactivación de la señalización extracelular
Inhibidor de la disociación D4-GDP	DELD/S	3	No se ha demostrado su efecto
Proteína fosfatasa 2A subunidad A α	DEQD/S	3	↑ actividad hacia sustratos no-cdk
Fosfolipasa A ₂ citosólica	DELD/A	3	Activación
Stat 1	MELD/G	3	↓ transcripción después interferon α o γ
NF κ Bp50, p65	?	3	↓ transcripción dependiente de NF κ B
I κ B	DRHD/S	3	Genera inhibidor constitutivo de NF κ B
Proteína resp. esteroide elemento-unión	DEPD/S	3,7	Ruptura no fisiológica
DCC	LSVD/R	3	Apoptosis por ausencia de factores
Calpastatina	ALDD/S	1,3,7	Disminuye inhibición de la calpaina
Proteínas de la regulación del ciclo celular y la proliferación			
P21 ^{waf1}	DHVD/L	3,7	Pérdida dominio inhibitorio N de cdk
P27 ^{kip1}	DPSD/S	3,7	↓ p27 en complejo ciclinaE-cdk
Proteína Rb(retinoblastoma)	DEAD/G	3	acción opuesta E2F-1
CDC27	?	3	↓ ligasa ubiquitina, estabilización ciclinas A,B
Proteínas en enfermedades genéticas.			
Huntington	DSVD/L	3,7	Posible ruptura no fisiológica
Proteína atrofia dentatorubral palidalisiana	DSL/D/G	3	Efecto no conocido
Presenilina-1	ARQD/S	?	Desconocido
Presenilina-2	DSYD/S	3	Genera fragmentos anti-apoptóticos
Proteínas reguladoras de la apoptosis			
Bcl-2	DAGD/V	?	Genera fragmentos pro-apoptóticos
Bcl-XL	HLAD/S	1,3	Genera fragmentos pro-apoptóticos
FLIPL	LEVD/G	3,8,10	Desconocido
Bid	LQTD/G	8	Genera fragmentos pro-apoptóticos
Bax	FIQD/R	?	Desconocido
ICAD	DEPD/S	3	Libera endonucleasa CAD activa

2.2.2. Estructura de las Caspasas

Las procaspasas se componen de cuatro dominios diferentes como se muestra en la Figura 2. Tienen un prodominio N-terminal, seguido por una subunidad grande, una subunidad pequeña y una secuencia de unión entre la subunidad grande y la subunidad pequeña. En la Tabla 3 se puede observar que esta secuencia de unión está flanqueada por residuos de aspartato que facilitan su procesamiento (28). La activación es consecuencia de la ruptura proteolítica entre los dominios, acción que elimina el prodominio y la secuencia de unión. Esto da como resultado el ensamblaje de dos subunidades grandes con dos subunidades pequeñas en un complejo enzimático activo. El análisis de la estructura cristalina de la caspasa 1 y la caspasa 3 unidas a un análogo de su sustrato muestra que la caspasa activa está compuesta de dos heterodímeros interaccionando mediante las subunidades pequeñas para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos (29, 30, 31). Cada sitio activo está formado por secuencias proporcionadas por la subunidad grande y por la subunidad pequeña.

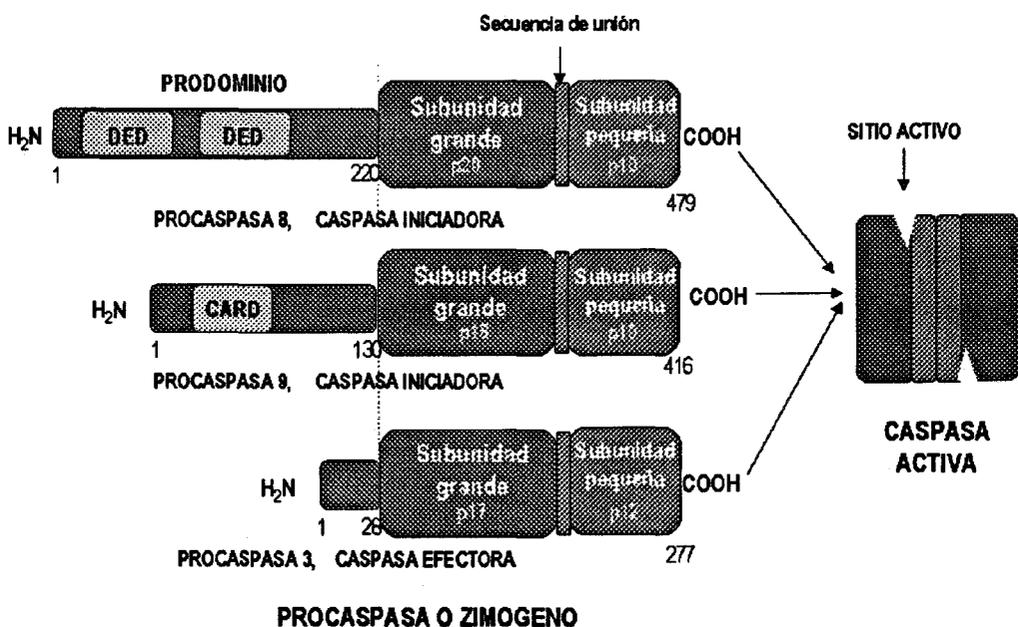


Figura 2. Diagrama de las estructuras de los zimógenos de las caspasas 8 y 9, que son caspasas iniciadoras y la caspasa 3, que es una caspasa efectora. En verde se muestra el prodominio aminoterminal, en rojo la subunidad grande, en naranja la subunidad pequeña, el fragmento de unión de ambas subunidades se muestra de color celeste. El prodominio de la caspasa 8 contiene dos dominios efectores de muerte (DED), el prodominio de la caspasa 9 presenta un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD). La caspasa activa es una proteína heterotetramérica que resulta de la activación proteolítica de dos procaspasas.

Como que se muestra en la Figura 3, en cada heterodímero la subunidad grande y la subunidad pequeña interaccionan para formar un núcleo compuesto por 6 láminas beta flanqueadas por 5 hélices alfa (29, 30, 31, 32), una estructura cuaternaria que es única entre las proteasas. Basados en la distancia entre el C-terminal de una

subunidad grande y el N-terminal de la subunidad pequeña, se ha sugerido que durante la maduración de los zimógenos de la caspasa 1 y de la caspasa 3, la subunidad p10 proveniente de un zimógeno forma un complejo con la subunidad p20 proveniente de un segundo zimógeno (29, 30, 31). La capacidad de ciertas mutantes de caspasa 1 para complementarse con otras cuando son coexpresadas (33) sustenta esta idea, aunque la incapacidad de mutantes de la caspasa 9 para complementarse con otras (34) plantea la posibilidad que otras caspasas pueden madurar de diferente manera.

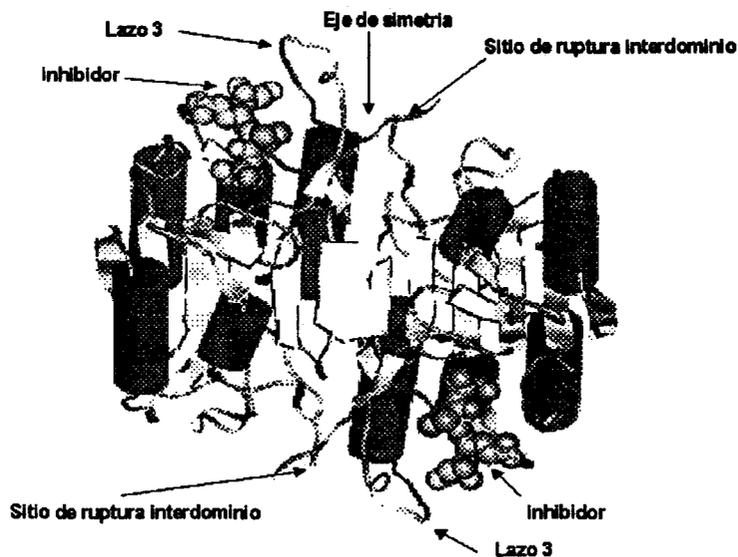


Figura 3. Estructura tetramérica de la caspasa 3. Las caspasas 1 y 3 presentan una conformación conservada que consiste de un cuerpo central de 6 láminas beta intercaladas entre 5 hélices alfa. La estructura muestra que las caspasas existen como tetrámeros formados por dos subunidades grandes y dos subunidades pequeñas determinando el origen de un dímero doble(33) [Figura tomada de Stennicke y Salvensen (35)]

El estudio de la estructura y mecanismo de catálisis de las caspasas tiene relevancia para comprender el mecanismo de acción de los análogos de sustratos e inhibidores que se emplean como herramientas en los estudios de apoptosis, los heterotetrameros presentan en su sitio activo 4 regiones de unión al sustrato (S1, S2, S3 y S4) a los que se unen con distinta afinidad los 4 residuos de aminoácidos del sitio de corte del sustrato (P1, P2, P3 y P4). Las caspasas hidrolizan enlaces peptídicos sobre el extremo carboxilo de un residuo de aspartato (llamado P1). El análisis de los sitios activos de las caspasas 1 y 3 indica que la ruptura probablemente involucre la desprotonación del sulfhidrilo de la cisteína 285 por el anillo de imidazol de la histidina 237; de este modo se genera un tiolato nucleofílico que ataca el átomo de carbono carbonilo del enlace escindido para formar un intermediario tetraédrico que es estabilizado por la unión de un hidrógeno localizado en el grupo amino del residuo de

glicina 238 (30). Estos residuos catalíticos, Cys285, His237 y Gly238, están altamente conservados en todas las caspasas.

Durante la catálisis el requerimiento del aspartato en la posición P1 del sustrato es absoluto (36, 37). Este aspartato está enterrado en un bolsillo profundo, llamado sitio S1, que está recubierto por los residuos de arginina 179, glutamina 283, arginina 341, y serina 347 (enumerados en caspasa 1) que interactúan directamente con P1. Todos estos residuos están conservados en las caspasas humanas (excepto en la caspasa 8 en que la serina 347 está reemplazada por treonina). Las caspasas no tienen preferencia por el sitio P2 del sustrato, en ninguna de las estructuras cuaternarias de las caspasas se ha encontrado un sitio S2 de unión bien definido para P2. Cuando el péptido Ac-DEVD.CHO forma un complejo con la caspasa 3 (Figura 4) se observa que el área circundante a P2 el residuo de valina está abierto y plano con sólo pocas o ninguna interacción específica. El sitio S4 dependiendo de la configuración del lazo 3 tiene distintas preferencias, el reconocimiento de P4 está basado en las interacciones específicas entre la enzima y el sustrato; debido a que el plegamiento del lazo 3 produce un ambiente restrictivo, la naturaleza de P4 es crítica para el reconocimiento. La cantidad de enlaces de hidrógeno que se establecen entre el grupo carboxilo de P4 y el lazo 3 condicionan el grado de especificidad. Así, en el caso de la caspasa 3, ésta tendrá mayor afinidad por un residuo de aspartato que por uno de ácido glutámico en la posición 4.

CASPASA 3

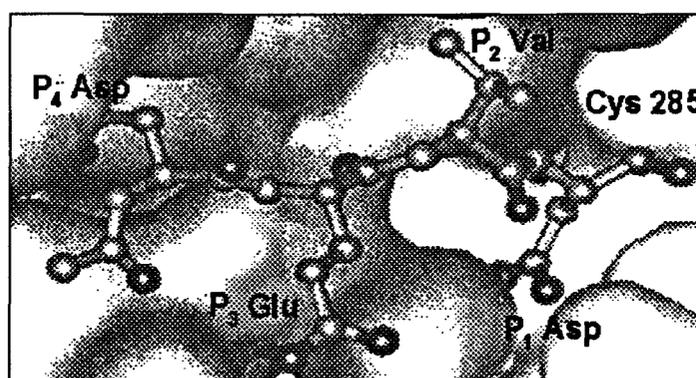


Figura 4. Sitio de unión del tetrapéptido sustrato DEVD en los sitios S1-S4 de la caspasa 3. Se observa que la subunidad grande (en blanco) aporta el primer sitio de interacción con el sustrato y que los demás sitios de interacción son aportados por la subunidad pequeña (en gris) [Figura tomada de Stennicke y Salvensen (35)].

La observación de que las caspasas son activas contra tetrapéptidos (36, 37) permitió el diseño y desarrollo de sustratos y de inhibidores específicos (38, 39). El péptido YVAD, que está basado en el motivo de corte preferido de la caspasa 1, permitió la

síntesis del Ac-YVAD.CHO, que inhibe a la caspasa 1 con una K_i de 0.76 nM y del Z-YVAD.AFC, un sustrato fluorogénico específico de caspasa 1. De igual manera, el motivo de corte específico de la caspasa 3, el tetrapéptido DEVD, permitió la síntesis del Ac-DEVD.CHO, un inhibidor de la caspasa 3 y del Z-DEVD.AFC, un sustrato fluorogénico específico de caspasa 3. El Z-VAD.CHO es considerado un inhibidor general de caspasas debido a que tiene capacidad de interactuar específicamente con el sitio S1 debido a la presencia del aspartato en posición P1, no teniendo la restricción del residuo en posición P4, lo que no confiere especificidad por el lazo 3 de las caspasas.

Las caspasas que participan en la MCP han sido divididas en caspasas iniciadoras (*upstream*) y caspasas efectoras (*downstream*) en función de su ubicación en la cascada proteolítica de caspasas.

2.2.3. Caspasas iniciadoras y caspasas efectoras

Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener un prodominio largo que contiene módulos proteicos específicos que le permite interactuar físicamente con proteínas activadoras específicas. En el prodominio de las caspasas iniciadoras se han detectado dos clases de módulos de interacción (ver la Figura 2): el dominio efector de muerte (DED) y el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (40, 41, 42). Las caspasas 8 y 10 presentan módulos DED y el CED-3 de *C. elegans* y las caspasas 1, 2, 4, 5 y 9 presentan módulos CARD distintos pero homólogos. Por otro lado las caspasas efectoras 3, 6, 7 y 14 presentan prodominios cortos y no presentan módulos de interacción.

2.2.4. Regulación de la activación y la actividad de las Caspasas

Las caspasas iniciadoras son activadas por un gran número de señales apoptóticas. En células de mamíferos se han descrito dos cascadas principales de activación de caspasas (Figura 5). En la primera cascada interactúan las caspasas 2, 8 y 10 con los receptores de muerte expresados en la superficie celular incluyendo Fas, TNFR1, DR3 y DR4/DR5. En la segunda cascada, la caspasa 9 es activada por varios estímulos provenientes tanto del exterior como del interior de la célula. La caspasa 8 y la caspasa 9 activadas pueden a su vez activar un grupo de caspasas efectoras tales como las caspasas 3, 6 y 7, dando como resultado el incremento de la actividad proteásica en la célula (43, 44, 45, 46).

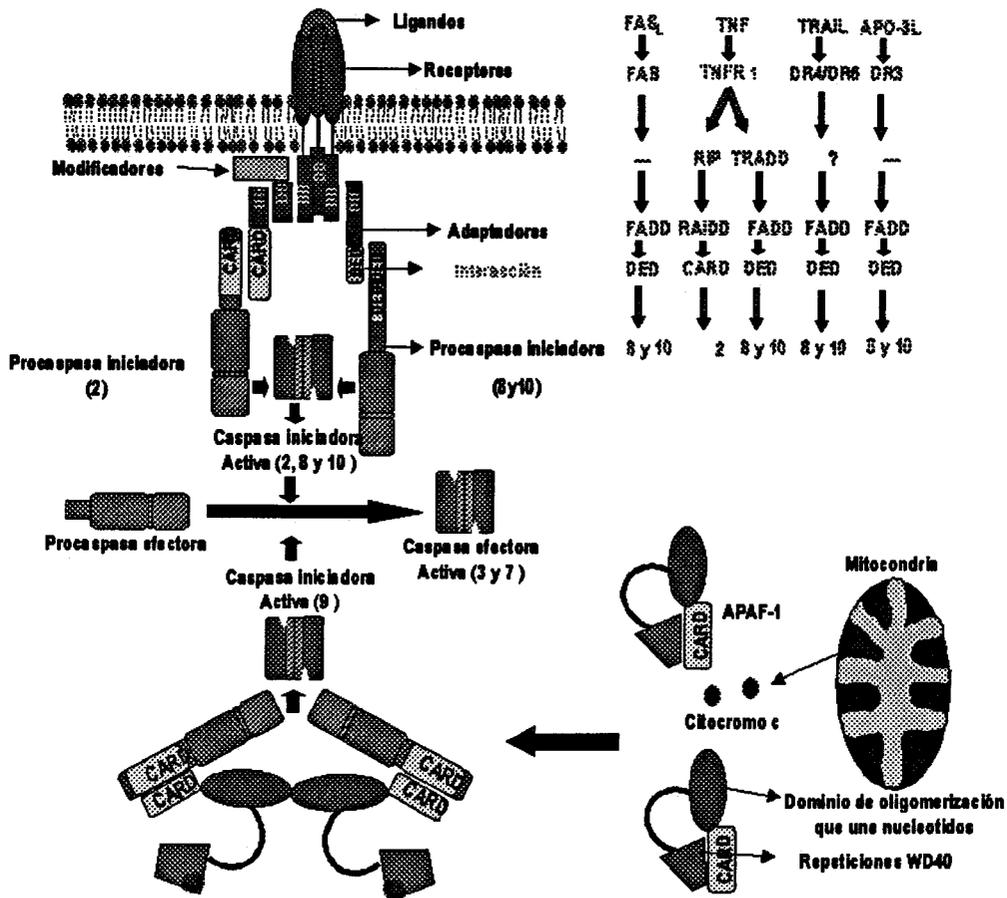


Figura 5. Modelos de activación de las caspasas iniciadoras 2, 8 y 10 inducidas por activadores de receptores de muerte celular y de la caspasa 9 inducida por factores que promueven la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma (para mayores detalles ver el texto)

En la activación de las caspasas mediada por la unión de un ligando a un receptor de muerte, la unión de los receptores, tales como FAS, a su respectivo ligando (FAS_L) induce a través de sus dominios de muerte (DD) el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como FADD, que a su vez recluta a la procaspasa 8 dentro del complejo de iniciación de la señal de muerte (DISC) (47). El dominio de muerte (DD) del receptor se une al correspondiente DD de FADD, y a su vez FADD y la procaspasa 8 interaccionan a través de sus respectivos dominios DED (40, 41, 47, 48, 49), el proceso de interacción inicia la autoactivación de la caspasa 8 (50, 51, 52, 53). Recientemente se ha demostrado que el prodominio de la caspasa 1 incrementa la apoptosis inducida por FAS_L facilitando la autoactivación de la caspasa 8 (54). El TNF puede iniciar dos vías de activación de caspasas, con la participación de moléculas modificadoras tales como RIP y TRADD. La vía de activación de las procaspasas 8 y 10 por TNF es básicamente similar a la inducida por FAS_L, con la diferencia de que el receptor es TNFR1 y entre éste y la proteína adaptadora FADD se agrega la proteína modificadoras la TRADD (49, 55). Sin embargo en la activación de la

procaspasa 2 por el TNF la formación del complejo de muerte tiene lugar mediante la interacción de los dominios CARD y no de los dominios DED. En dicha interacción participan secuencialmente el TNF, que inicia la unión al receptor TNFR1, la proteína modificadora RIP que se une al receptor a través de interacciones DD, el adaptador RAIDD, que se une a RIP a través de sus dominios DD, y la procaspasa 2, que se une a RAIDD a través de la interacción de sus respectivos dominios CARD, iniciando el proceso de autoactivación de la caspasa 2 (ver la figura 5) (56, 57, 58, 59). La activación de las procaspasas 8 y 10 inducida por la activación de los receptores DR3, DR4/DR5, es básicamente similar a la inducida por la activación de FAS (60, 61).

En el caso de la procaspasa 9, una señal de muerte procedente del exterior o del interior de la célula induce la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma (62, 63, 64, 65). El citocromo c puede interactuar con las secuencias repetidas WD40 del extremo C-terminal de la Apaf-1 gracias a una modificación postraduccional por metilación de su residuo de lisina 72 (66,67). Esta unión requiere de dATP o ATP (68, 69), produciéndose entonces la oligomerización de Apaf-1, cuya consecuencia más importante es la apertura de los dominios CARD de Apaf-1, facilitándose así la interacción con los dominios CARD de la procaspasa 9 y dando lugar a lo que se ha llamado complejo apoptosoma. La formación del apoptosoma inicia el proceso de activación de la caspasa 9 (70, 71, 72). Recientemente se ha encontrado que el papel antiapoptótico de la proteína Hsp 70 se debe a su capacidad de interactuar con los dominios CARD de Apaf-1 evitando la oligomerización de Apaf-1 y su asociación con la caspasa 9 (73, 74, 75)

Las caspasas efectoras son activadas por las caspasas iniciadoras mediante un mecanismo que implica el procesamiento y la eliminación de la secuencia de unión en el residuo de aspartato 297. Existen evidencias de que la caspasa 8 puede activar a las caspasas 3, 4, 7 y 9 *in vitro* (46, 76, 77); la caspasa 10 puede activar las procaspasas 3, 7, y 8 *in vitro* (78); y la caspasa 9 puede activar a la caspasa 3, que tiene capacidad de activar *in vitro* a las caspasas 2, 6, 8 y 10 (79).

La regulación transcripcional de la expresión de los genes de las procaspasas puede tener importancia en la regulación de la apoptosis bajo ciertas circunstancias (23, 80). Así, el interferón- γ incrementa la expresión de caspasas y la susceptibilidad a la apoptosis en células humanas de leucemia U937 (81). Por otra parte, las células que carecen del factor regulador de interferón 1 (IRF-1) y del factor transductor de señales y activador de la transcripción -1 (STAT-1) tienen bajas concentraciones de ARNm de

las caspasas 1, 2 y 3 y una pobre respuesta apoptótica a ciertas señales (82, 83). En la actualidad se conoce poco sobre la manera en que estos factores de transcripción regulan la expresión génica de las caspasas.

La actividad de las caspasas puede ser reguladas por modificaciones postraduccionales. Diversos estudios realizados *in vitro* han mostrado que el óxido nítrico (NO) inhibe directamente a las caspasas mediante la S-nitrosilación de un residuo de cisteína del sitio activo (84, 85). Recientemente se ha encontrado que el NO inhibe a las caspasas por S-nitrosilación *in vivo* (86). Por otro lado, y a pesar de que varios estudios han sugerido que el proceso de apoptosis puede estar regulado por proteínas quinasas y por fosfatasas (87, 88), la evidencia experimental que apoya la regulación de las caspasas por fosforilación es todavía circunstancial. En este sentido, se ha descrito que la proteína RIP, que participa en el reclutamiento de la caspasa 2 por el complejo TNFR1, es una serina/treonina quinasa que puede unirse a la procaspasa 1 *in vitro*, promoviendo su activación (56), aunque no hay evidencia directa de que RIP pueda actuar fosforilando la procaspasa 1(89). En células de leucemia humana marcadas con $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$, se ha encontrado que el estímulo apoptótico promueve la incorporación del marcaje radiactivo a varias caspasas que como consecuencia tenían una movilidad electroforética alterada. La desfosforilación estuvo asociada con el incremento de capacidad de degradar PARP (88). Otro estudio muestra que la Akt quinasa puede fosforilar la caspasa 9 inhibiendo su actividad (90). Por último, la activación de las caspasas está regulada por inhibidores. Así, la activación de las procaspasas, secundaria a su interacción con receptores de muerte activados, está regulada por polipéptidos llamados FLIP (FADD-like ICE inhibitory protein)(91, 92) que se han encontrado en diversos virus (vFLIP) y tienen un homólogo en humanos (cFLIP), que es denominado también por los acrónimos CLARP, Flame-1, CASH, casper, MRIT, y I-FLICE (92). FLIP contiene dos secuencias DED que pueden unirse a los prodominios de las caspasas 8 y 10, impidiendo su reclutamiento por los receptores de muerte (92, 93). Recientemente se ha descrito que la interacción TRADD-TRAF-1 y TRADD-TRAF2 es un mecanismo novedoso de inhibición de la señal de muerte inducida por la activación de TNFR-1 debido a que TRAF-1 y TRAF-2 interaccionan con las proteínas inhibitoras de apoptosis (cIAPs), produciendo la inhibición directa de la activación de las procaspasas 8 y 10 (94, 95). Los virus siguen una estrategia similar para inhibir la activación de las procaspasas, así la proteína E8 del virus del herpes equino tipo II, o las proteínas MC159 y MC160 del virus

molluscum contagiosum, contienen secuencias DED homólogas a las de las caspasas 8 y 10 e inhiben el reclutamiento de las procaspasas por DISC (96, 97). Otras proteínas virales como la CrmA virus de la vacuna y la p35 del baculovirus pueden unirse e inhibir a las caspasas 1 y 8 activas (98, 99, 100, 101). Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) son una familia de inhibidores de caspasas que se han identificado en base a la homología de las IAPs de baculovirus (102). Diferentes IAPs contienen de uno a tres dominios N-terminal llamados BIR (baculovirus IAP repeat) que permiten la oligomerización de las IAPs necesaria para que ejerzan su papel antiapoptótico (103). Estas proteínas contienen además dominios estructurales que han sido descritos en otras moléculas tales como RING y CARD. Al parecer la inhibición de la apoptosis por las IAPs es debida a una interacción directa con las caspasas. Tres IAPs de humanos –XIAP, cIAP1 y cIAP2- pueden unirse específicamente e inhibir las caspasas 3 y 7 *in vitro* (104). Aunque permanece por determinar cuál es el papel fisiológico de las IAPs, éstas actúan inhibiendo las caspasas activas y evitando el procesamiento y activación de las procaspasas (2). Se ha demostrado que las IAPs también pueden bloquear la apoptosis mediada por Apaf-1, al parecer mediante interacción con la caspasa 9 (105). La activación de la procaspasa 9 por el Apaf-1, el citocromo c y el dATP está regulada por miembros de la familia antiapoptótica de Bcl-2. Las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, que están localizadas predominantemente en la parte externa de la membrana mitocondrial (106, 107) pueden inhibir la liberación de citocromo c (63, 108) porque Bcl-2 y Bcl-X_L pueden formar heterodímeros con los otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax, Bid o Bik) y servir como trampa para impedir la estimulación de la liberación de citocromo c (109, 110). Además, se ha mostrado que Bcl-X_L inhibe la formación del apoptosoma (111), aunque estos resultados han sido recientemente cuestionados (112). Se ha descrito que las proteínas mitocondriales Smac/DIABLO, que salen de la mitocondria junto con el citocromo c, promueven la activación de caspasas por el apoptosoma. La porción N-terminal de la Smac es imprescindible para que se una al motivo BIR de la IAP y así neutralizar su actividad inhibitoria (113, 114).

2.3. Proteínas de la familia de Bcl-2.

La familia de proteínas de Bcl-2 está formada por miembros antiapoptóticos y proapoptóticos que controlan la vida o la muerte de la célula (115, 116). Los miembros de esta familia de proteínas están estrechamente emparentados ya que presentan homología en uno o más de sus cuatro regiones denominadas dominios BH (Bcl-2

homology), BH1, BH2, BH3 y BH4 (Figura 5). Los dominios BH confieren diferentes características funcionales a la proteína en el control de la muerte o supervivencia de la célula. Mediante estudios de mutagénesis se ha encontrado que el dominio BH3 es crítico para la inducción de la apoptosis, está altamente conservado en las proteínas proapoptóticas y también es crítico para la dimerización con las proteínas antiapoptóticas, aunque para esta función también son necesarios los dominios BH1 y BH2 (117). El dominio BH4, ubicado en la región N-terminal de la proteína, está presente en los miembros antiapoptóticos, con la excepción de los miembros proapoptóticas DIVA y Bcl-XS. Este dominio no es necesario para la dimerización, pero se piensa que está involucrado en las interacciones proteína-proteína con otras proteínas reguladoras que no son de la familia Bcl-2, como por ejemplo las proteínas quinasas (118, 119). La pérdida del dominio BH4 anula la función antiapoptótica (120) y hasta confiere propiedades proapoptóticas a la proteína (121). El dominio transmembrana (TM) confiere a las proteínas de la familia de Bcl-2 la propiedad de integrarse en membranas intracelulares. La pérdida del dominio TM no influye en la función de estas proteínas (revisado en 122). Son ejemplos de proteínas sin TM, las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_LΔTM y A1 (Bfl-1), y las proteínas proapoptóticas Bad, Bid y Egl-1, todas ellas están localizadas en el citoplasma en condiciones normales.

2.3.1. Clasificación de las Proteínas de la familia de Bcl-2.

Hasta ahora se han aislado alrededor de 20 proteínas relacionadas con Bcl-2 (122, 123), que han sido agrupadas en dos categorías (Figura 6):

1. Miembros antiapoptóticos tales como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 y A1 (Bfl-1). Todas estas proteínas comparten homología en los cuatro dominios BH, aunque algunos miembros no tengan un dominio BH4 aparente. En este grupo también se incluyen también la proteína Boo que no presenta dominio BH3 (124) y la proteína Ced-9 de *C. elegans*.
2. Miembros proapoptóticos, que se pueden agrupar en:
 - a. Los que presentan homología en más de un dominio BH, tales como Bax, Bak, Mtd (Bok), Diva. Todas estas proteínas ejercen un efecto proapoptótico y comparten homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no en el dominio BH4.

- b. Los miembros que sólo presentan dominio BH3. Son proteínas proapoptóticas e incluyen a Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk (DP5), Blk, Bnip3, Bnip3L y Egl-1. Estas proteínas sólo comparten homología en el dominio BH3.

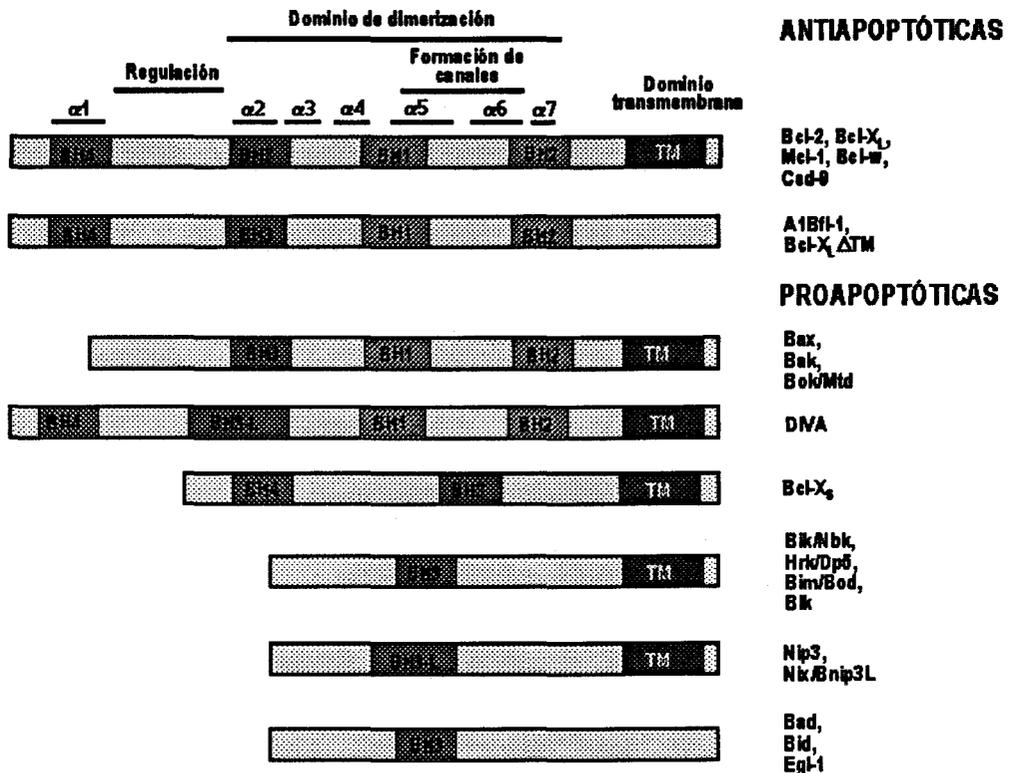


Figura 6. La familia de Bcl-2. Los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 son secuencias conservadas. $\alpha 1$ - $\alpha 7$ indican las α -hélices identificadas en Bcl-X_L; un núcleo de dos hélices hidrofóbicas $\alpha 5$ - $\alpha 6$ está rodeada por cinco hélices anfipáticas. La región entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es llamada lazo (loop) de Bcl-2 que en muchas condiciones tiene un papel regulador. Algunos de los miembros de la familia no contienen dominio transmembrana, Bcl-X_s es el resultado del corte y empalme alternativo del RNA mensajero de Bcl-X.

2.3.2. Mecanismos de acción de las Proteínas de la familia de Bcl-2.

Se han descrito tres mecanismos generales de acción para esta familia de proteínas.

(a) Dimerización con otras proteínas de la misma familia; (b) unión a proteínas no homólogas; (c) formación de poros o canales iónicos.

- a. Dimerización de proteínas de la familia Bcl-2. Los miembros antiapoptóticos (como Bcl-2) pueden formar heterodímeros con los miembros proapoptóticos (como Bax). La dimerización está mediada por la inserción del dominio BH3 de una proteína proapoptótica dentro de una hendidura hidrofóbica configurada por los dominios BH1, BH2 y BH3 de las proteínas antiapoptóticas (125, 126). En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han permitido determinar que Bcl-2 es capaz de prolongar la supervivencia de las células en ausencia de Bax, y que Bax promueve la muerte de las células cuando Bcl-2 no está presente (127, 128, 129, 130, 131, 132). El concepto de que Bcl-2 y Bax pueden ser

capaces de funcionar independientemente y con funciones antagónicas, hace que la dimerización entre los miembros de la familia de Bcl-2 sea un importante mecanismo en el control de sus respectivas actividades biológicas. Los miembros que sólo presentan BH3 operan como inhibidores transdominantes de las proteínas antiapoptóticas contando exclusivamente con el mecanismo de dimerización para esta actividad. Una situación análoga ocurre en *C. elegans*, en donde la proteína Ced-9 se inhibe tras su interacción con la proteína Egl-1. Las propiedades y características funcionales de la dimerización del grupo de proteínas que sólo tienen BH3 contrastan con las otras proteínas proapoptóticas tales como Bax, Bak, y Bok que comparten un alto grado de homología con Bcl-2. Los estudios moleculares sugieren que proteínas tales como Bax probablemente asumen la misma configuración general que Bcl-X_L (133). Al contrario de lo que sucede con las proteínas que sólo tienen BH3, Bax y Bak pueden formar homodímeros entre sí, además de la dimerización con Bcl-2 y Bcl-X_L o Mcl-1. La dimerización entre Bax y las proteínas antiapoptóticas suprime esta función.

Los miembros de la familia que tienen TM pueden integrarse en la membrana mitocondrial externa, en el retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear. Dos miembros de las proteínas que sólo tienen BH3 (Bad y Bid) no presentan TM. La localización de estas proteínas en las células esta dinámicamente controlada por la asociación/disociación con otras proteínas de la familia Bcl-2, resultando en una translocación regulada entre el citoplasma y la superficie de los orgánulos. Por ejemplo, Bad dimeriza con Bcl-X_L y en algunos casos con Bcl-2; el dímero transloca a la membrana mitocondrial externa y promueve la apoptosis (134). La fosforilación de Bad por proteínas quinasas como Akt/Pkb, Raf-1 y PKA impide la dimerización y por lo tanto la apoptosis (135, 136, 137, 138), y facilita la asociación entre Bad y la proteína 14-3-3 (139, 140). Bid también transloca a las membranas cuando las células se exponen a estímulos proapoptóticos. Tras una señal apoptótica, la proteína Bid es hidrolizada por la caspasa 8 (141) y por el complejo proteosoma dependiente de ubiquitina (142), dando lugar a t-Bid (truncated Bid). Esta proteína forma dímeros con Bax o con Bcl-2/Bcl-X_L y es crítica para la función proapoptótica, de manera que Bid puede funcionar como activador de Bax o como inhibidor de Bcl-2/Bcl-X_L (141). Las consecuencias de esta asociación son comentadas en detalle en el apartado de control mitocondrial de la apoptosis.

- b. Unión a otras proteínas que no pertenecen a la familia de Bcl-2. Se ha descrito que tanto Bcl-2 como Bcl-X_L pueden interactuar con un grupo heterogéneo de proteínas, entre las que se incluyen Apaf-1, FLIP, Raf-1, la calcineurina, la chaperona reguladora de Hsp70 BAG-1, la 53BP-2 proteína de unión a la p53, la proteína prion celular (PrP), la SMN de la distrofia miotónica y la proteína tanslocadora de nucleótidos de adenina (ANT). La interacción con estas proteínas es mediante sus dominios BH4. Algunas de estas interacciones tienen repercusiones funcionales establecidas, como su papel en la activación de los factores de transcripción NF-AT y P53 (119,143), en la regulación de las actividades antiapoptóticas de BAG-1 y de Raf-1(144,145) y en la regulación de la actividad proapoptótica de ANT.
- c. Formación de poros o canales iónicos. La estructura tridimensional de la Bcl-X_L (146) y Bid (147, 148) muestra que hay similitudes estructurales entre estas proteínas y los dominios formadores de canales de las toxinas bacterianas colicinas y toxina diftérica. Debido a esta similitud estructural las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L y Bax pueden formar canales iónicos en membranas lipídicas sintéticas (109, 110, 149, 150). Se ha propuesto que los canales formados por Bcl-2 y Bcl-X_L son pequeños, generalmente adoptan una configuración cerrada y tienen preferencia por cationes. Bax por el contrario forma canales grandes que adoptan configuración abierta y tienen preferencia por aniones (133). La actividad formadora de canales de estas proteínas no ha sido demostrada in vivo, aunque si está claro que estas proteínas se asocian a membranas intracelulares, en particular a la membrana mitocondrial externa. En general, la función más importante hasta ahora conocida para las proteínas de la familia de Bcl-2 es el control de la salida de factores apoptogénicos de la mitocondria, tema que será tratado con mayor amplitud en el apartado 2.4.2.

2.3.3. Control de la acción de las proteínas de la familia de Bcl-2 por modificaciones postraduccionales.

Los estímulos extracelulares pueden afectar la actividad de las proteínas de la familia de Bcl-2, promoviendo en ellas cambios postraduccionales tales como fosforilaciones y oxidaciones. Se ha observado que la fosforilación de Bcl-2 puede controlar su acción anti o proapoptótica. Así, agentes inhibidores de la polimerización de microtúbulos que inducen la apoptosis, provocan un incremento de la fosforilación de Bcl-2 que está

asociado con un incremento de la actividad quinasa de c-Raf-1, JUN-1 y CDC-2 (151-156). La delección o las mutaciones puntuales en el residuo de serina 70 de la región del lazo que conecta los dominios BH3 y BH4 cancela los efectos de los inhibidores e incrementa la actividad antiapoptótica de Bcl-2 (157).

Tanto la IL-3 como la eritropoyetina y la briostatina estimulan la activación y la translocación de la PKC α a la mitocondria. Esta acción está correlacionada con el incremento de la fosforilación de Bcl-2 y de su actividad antiapoptótica (158, 159). La sustitución del residuo serina 70 por alanina produce una disminución de la fosforilación de Bcl-2 y de su actividad antiapoptótica. Por el contrario, si la mutación es del residuo serina 70 por ácido glutámico, se incrementa la fosforilación y la actividad antiapoptótica (160). El factor de crecimiento neuronal (NGF) estimula la fosforilación de Bcl-2 y su actividad antiapoptótica. En este caso, la fosforilación de Bcl-2 es dependiente del sistema de la MAP quinasa (161).

La apoptosis inducida por ciertos estímulos está asociada con un marcado descenso en la concentración de Bcl-2 *in vivo* (162-164). Se ha descrito recientemente que durante la apoptosis inducida por el TNF α se produce la desfosforilación de Bcl-2 y su degradación por un mecanismo dependiente de ubiquitina que se acompaña de una disminución de la actividad de MAP quinasa (165). En experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que la MAP quinasa fosforila a Bcl-2 predominantemente en los residuos serina 87 y treonina 74 y le confiere resistencia a la degradación proteolítica y cancela la apoptosis inducida por el TNF α (166).

La fosforilación de la proteína proapoptótica Bad ha sido ampliamente estudiada. Señales extracelulares de supervivencia como la IL-3, el NGF y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 promueven la fosforilación de Bad a través de la vía dependiente de PI3-quinasa/Akt (136). La consecuencia de la fosforilación de Bad en los residuos de serina 112 y 136 es la inhibición de su unión con Bcl-X $_L$ y su secuestro por la proteína 14-3-3 (139, 140). La fosforilación de Bad en la serina 136 es dependiente de Akt, mientras que la fosforilación en la serina 112 parece estar mediada por quinasas como la PKA asociada a la mitocondria (138) y la MAPKAP-K1 también llamada RSK (167, 168). Recientemente se ha descrito que la PAK-1 (p21-Activated Kinase 1) activada por la IL-3 fosforila a Bad tanto en los residuos de serina 112 y 136 y protege a las células de la apoptosis inducida por la retirada de IL-3 (169). También se ha sugerido un tercer sitio de fosforilación de Bad en la serina 155 inducida por señales de supervivencia y mediada por la PKA. La fosforilación de este

residuo requiere la fosforilación previa de la serina 136 y el reclutamiento de Bad por la proteína 14-3-3, siendo esta fosforilación la responsable de la ruptura de la interacción Bad-Bcl-2/Bcl-X_L. Estos resultados indican además que la proteína 14-3-3 es un cofactor que regula la fosforilación secuencial de Bad (140, 168). En la apoptosis inducida por el Ca⁺⁺, la activación de la fosfatasa dependiente de calcio, la calcineurina, produce la desfosforilación de Bad e incrementa la formación de dímeros con Bcl-X_L (170, 171).

2.4. Control mitocondrial de la apoptosis

El concepto de que la mitocondria desempeña un papel fundamental en la coordinación de las acciones ejecutoras en la apoptosis deriva de los estudios realizados por Newmeyer y col. (172) que muestran que la mitocondria era necesaria para que los extractos citoplasmáticos indujeran cambios morfológicos típicos de apoptosis en núcleos aislados de huevos de *Xenopus*. Posteriormente, el fraccionamiento y la purificación de los extractos citoplasmáticos mostraron que el citocromo c, el dATP y la proteína Apaf-1 eran necesarias para activar las caspasas. Además de la liberación del citocromo c, otras proteínas normalmente confinadas en el espacio intermembrana de la mitocondria, tales como el AIF (apoptosis-inducing factor) y la proteína Smac/DIABLO, se liberan al citoplasma durante la apoptosis. El AIF controla la apoptosis nuclear (revisado en 173) y la Smac regula la inactivación de las IAPs (113). La liberación de proteínas mitocondriales está controlada por los miembros de la familia Bcl-2, aunque todavía los mecanismos de este control no han sido completamente dilucidados.

2.4.1. La mitocondria normal y la mitocondria durante la apoptosis

Las mitocondrias son orgánulos que presentan dos compartimientos definidos: la matriz que está delimitada por la membrana mitocondrial interna (MI) y el espacio intermembrana que está delimitado por la membrana mitocondrial externa (ME). La MI está plegada formando numerosas crestas que incrementan su área de superficie. En las crestas mitocondriales se encuentran las proteínas de la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa y la ANT. En condiciones fisiológicas normales la MI es casi impermeable, después de que la cadena respiratoria ha formado un gradiente electroquímico ($\Delta\Psi$). El $\Delta\Psi$ se produce como consecuencia de que la cadena transportadora de electrones bombea protones hacia el espacio intermembrana, acción que es indispensable para que la ATP sintasa fosforile el ADP en ATP. El ATP generado en la matriz es luego exportado en un sistema de intercambio por ADP

realizada por la ANT. La proteína más abundante de la ME es la VDAC (voltage-dependent anion channel), que en condiciones normales es permeable a solutos mayores de 5.000 Da. La matriz mitocondrial contiene un grupo moléculas pequeñas altamente seleccionadas, en cambio el espacio intermembrana es químicamente equivalente al citoplasma con respecto a los solutos de bajo peso molecular. Sólo 13 subunidades de la cadena respiratoria son codificadas por el genoma mitocondrial que reside en la matriz, todas las demás proteínas mitocondriales (alrededor del 99 %) son codificadas por el genoma nuclear, traducidas en los ribosomas del citoplasma y selectivamente importadas a los compartimientos mitocondriales.

La permeabilización de la ME durante la apoptosis produce la liberación de proteínas que normalmente están confinadas en el espacio intermembrana. La permeabilización de la ME puede ser estudiada con microscopia confocal o por el seguimiento de proteínas intermembranas quiméricas con proteína fluorescente verde (GFP). En algunos modelos de apoptosis, la microscopia electrónica muestra roturas de la ME con salida localizada de la MI (174, 175). La permeabilización de la MI es menos intensa que la de ME, incrementa su permeabilidad a los solutos de hasta 1,500 Da y se manifiesta como una disipación del gradiente de protones responsable del potencial de membrana ($\Delta\Psi$), una salida de pequeñas moléculas como el calcio y el glutatión, o una afluencia de agua y sacarosa, que inicia el hinchamiento de la matriz. La permeabilización de la MI se puede estudiar midiendo la concentración de calcio (176) o determinando la reducción en el $\Delta\Psi_m$, utilizando cationes lipofílicos fluorescentes como el DiOC6(3) (ioduro de 3,3' dihexyloxacarbocyanina) que se acumulan en la matriz mitocondrial dependiendo del $\Delta\Psi_m$. La reducción en la intensidad de fluorescencia se interpreta como la disipación del $\Delta\Psi_m$ (176).

2.4.2. Control de la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria por proteínas de la familia de Bcl-2

Cuando las células son expuestas a estímulos apoptóticos, se observa que la ME y/o la MI presenta signos de permeabilización seguido de la liberación de citocromo c. El principal mecanismo de regulación de la apoptosis por las proteínas de la familia de Bcl-2 es mediante el control de la liberación de citocromo c.

La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-X_L en células expuestas a estímulos apoptóticos impide la liberación de citocromo c, la activación de caspasas y la muerte celular (62, 63, 174). Los experimentos realizados en sistemas acelulares indican que la Bcl-2

exógena se asocia con la membrana mitocondrial para prevenir la liberación de citocromo c (63). Contrariamente a Bcl-2, la adición de Bax a mitocondrias aisladas o su expresión ectópica en ausencia de estímulos apoptóticos da lugar a la liberación de citocromo c (177-181). Este efecto puede ser cancelado por la sobreexpresión de Bcl-X_L en células intactas o por la adición de Bcl-X_L recombinante en mitocondrias aisladas (178, 182, 183). Los inhibidores de caspasas no afectan la liberación de citocromo c inducida por Bax, pero si bloquean la actividad de caspasas y retrasan la apoptosis (177-179, 182). Estos datos indican que Bax puede inducir directamente la liberación de citocromo c y que las caspasas no participan en esta acción.

Aunque se considera que Bcl-2 está generalmente unida a las membranas, particularmente a la membrana mitocondrial, esto no sucede con otras proteínas de la familia, como es el caso de Bad, Bid y Bim que están localizadas en el citoplasma y se translocan a la mitocondria durante la apoptosis. Estas proteínas tienen un papel importante en la transducción de señales del citoplasma a la mitocondria, donde pueden formar heterodímeros y regular la actividad de los otros miembros de la familia que controlan la liberación de citocromo c (Figura 7). La translocación de estas proteínas se produce por modificaciones postraduccionales específicas tales como la desfosforilación de Bad (171) o la proteólisis de Bid por la caspasa 8 (141). En condiciones basales, la localización de Bax es predominantemente citoplasmática, aunque en algunos casos se encuentra en la periferia de la mitocondria. Después de una señal apoptótica, Bax sufre una serie de cambios que culminan con su activación. En primer lugar, Bax se transloca del citosol a la mitocondria (184-186) a no ser que ya esté previamente unida a la membrana (179, 187). A continuación, Bax sufre un cambio conformacional que hace que el extremo N-terminal deje libre al extremo C-terminal (187), lo que conlleva a una aparente oligomerización (186, 188), que en algunos casos además puede ser inducida por Bid (188). Finalmente, Bax se inserta en la membrana mitocondrial externa a manera de proteína integral de membrana (188, 189), promoviendo a continuación la liberación de citocromo c mediante la formación de canales (Figura 7).

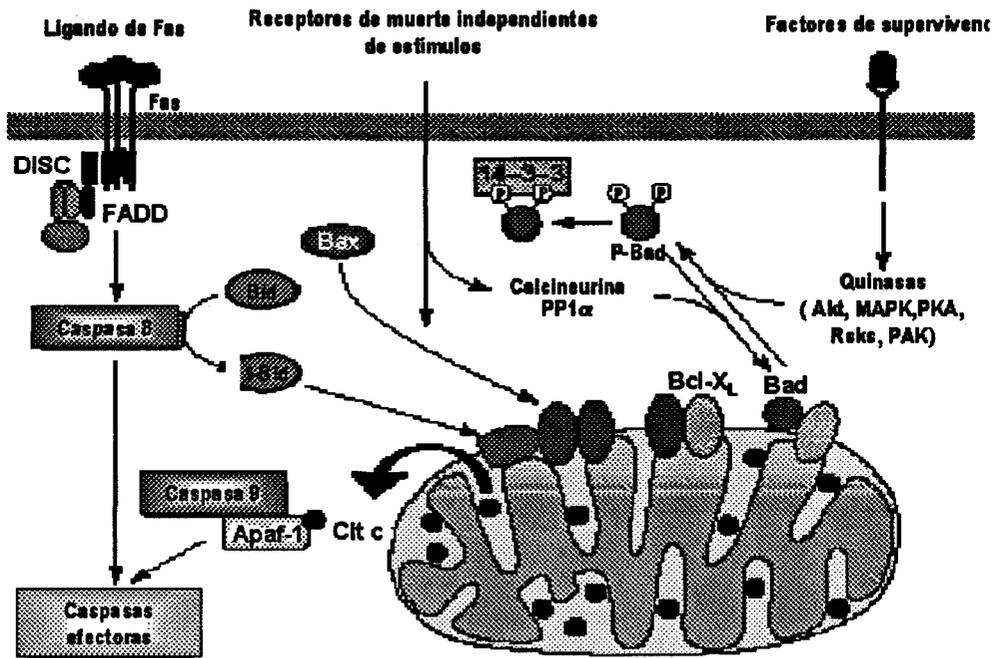


Figura 7. Control de la liberación de proteínas apoptogénicas por proteínas "solo BH3" de la familia de Bcl-2, Bid y Bad. Estas proteínas son reclutadas por vías de señalización específicas. La señalización iniciada por FasL, promueve la activación de la caspasa 8, la que hidroliza a Bid, luego el fragmento C-terminal (t-Bid) se transloca a la mitocondria, donde activa a Bax o proteínas similares a Bax, dando lugar a la liberación de citocromo c. Los receptores de muerte independientes de estímulos y la retirada de los factores de supervivencia pueden inducir apoptosis a través de la translocación de Bax o Bad a la mitocondria. En células sanas, Bad puede ser fosforilada en respuesta a factores de supervivencia por diversas quinasas en dos residuos de serina que facilita su reclutamiento por la proteína 14-3-3. Durante la apoptosis, Bad es desfosforilada por la calcineurina o por la proteína fosfatasa 1 α (PP1 α) y se transloca a la mitocondria, donde se une a Bcl-X_L, desplazando a Bax de los dímeros Bcl-X_L/Bax, inhibiendo la actividad represora de Bcl-X_L. Los dímeros Bad/Bcl-X_L tienen actividad proapoptótica debido a la capacidad transdominante de Bad.

Los cambios inducidos por Bax pueden ser contrarrestados por Bcl-2 y Bcl-X_L (186, 187) y pueden ser reproducidos por t-Bid (187, 188). La acción de Bcl-2/Bcl-X_L y Bid sobre Bax es a través de la interacción directa de los dominios BH3 dando lugar a la formación de heterodímeros (117).

Además las proteínas de la familia de Bcl-2 pueden actuar independientemente de la mitocondria. Las mutantes de Bcl-2 que no pueden unirse a la mitocondria (Bcl-2 Δ TM) retienen significativamente su capacidad de suprimir la apoptosis. De igual manera la apoptosis inducida por la microinyección de citocromo c es reducida por la sobreexpresión de Bcl-2 (190, 191).

Utilizando una proteína quimérica de citocromo c con proteína verde fluorescente se ha mostrado recientemente que durante la apoptosis inducida por una serie de estímulos todo el citocromo c-GFP fue liberado en un espacio de tiempo de 5 minutos de manera invariable e independiente de la temperatura (192).

A partir de estos datos se puede deducir que en la actualidad existe gran controversia acerca de los mecanismos por los que el citocromo c sale de la mitocondria durante la

apoptosis, lo que da lugar a que se hayan propuesto diversos modelos para explicarlos (Figura 8). Los modelos propuestos pueden ser agrupados en: a) Los modelos que predicen que la membrana mitocondrial externa se rompe como resultado del hinchamiento de la matriz mitocondrial, y b) Los modelos que predicen la formación de canales sin daño de la membrana mitocondrial externa.

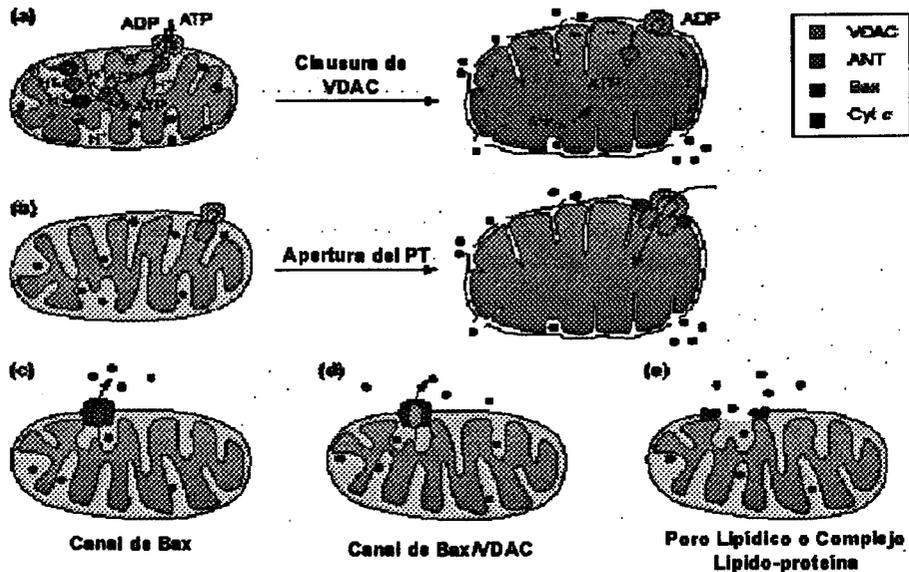


Figura 8. Modelos de la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol durante la apoptosis. (a,b) La ruptura de la membrana externa debido al hinchamiento de la matriz mitocondrial provoca la liberación de proteínas del espacio intermembrana. (a) Modelo de la clausura del VDAC: defectos en el intercambio de ATP/ADP, produce la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna, dando lugar al hinchamiento de la mitocondria y la ruptura de la membrana externa. (b) La formación del PT induce el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la ruptura de la membrana externa. Bax puede inducir la apertura del PT mediante la unión con la ANT en los sitios de contacto entre la membrana interna con la membrana externa. (c-e) Modelos propuestos por la teoría de formación de canales en la membrana mitocondrial externa. (c) canales formados sólo por Bax. (d) canales formados por la asociación Bax/VDAC. (e) la inserción de Bax altera la membrana mitocondrial externa dando lugar a la formación de canales de lípidos o complejos lípidos proteínas.

1. La teoría de la ruptura de la membrana externa.

Esta teoría propone dos modelos (Figura 8a y 8b), el primero relacionado con la apertura de un megacanal llamado el poro responsable de su permeabilidad transitoria (PT) debido a la hiperpolarización de la MI que precede a la liberación del citocromo c (193). El PT no está bien caracterizado en términos moleculares, pero se ha propuesto que une la ME con la MI en sitios en que las dos se yuxtaponen (194). El ANT de la membrana interna, el VDAC de la membrana externa y la ciclofilina D de la matriz forman la unidad básica del PT (Figura 9). La apertura del PT puede ser iniciada por diversos efectores fisiológicos tales como el calcio, bajas concentraciones de nucleótidos de adenina, fosfatos inorgánicos, especies reactivas de oxígeno, productos de la peroxidación de lípidos, el óxido nítrico, cambios en el pH y posiblemente Bax (194, 195). La apertura del PT

causa un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna que permite el paso de proteínas de aproximadamente 1.500 Da, a esta acción se le conoce como “permeabilidad transitoria”, lo que produce una inmediata disipación del cambio de potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) y un equilibrio químico entre el citoplasma y la matriz mitocondrial (194), provocando un hinchamiento progresivo de la matriz hasta producir la ruptura de la membrana externa.

El argumento que apoya esta teoría parte de la observación de que el $\Delta\Psi_m$ disminuye cuando las células entran en apoptosis (196, 197). Consecuentemente con ello, los inhibidores específicos del PT, el ácido bongkrécico y la ciclosporina A (CsA) pueden prevenir la apoptosis, mientras que agentes inductores del PT como el atractilósido puede inducir el hinchamiento mitocondrial y la apoptosis (194, 196).

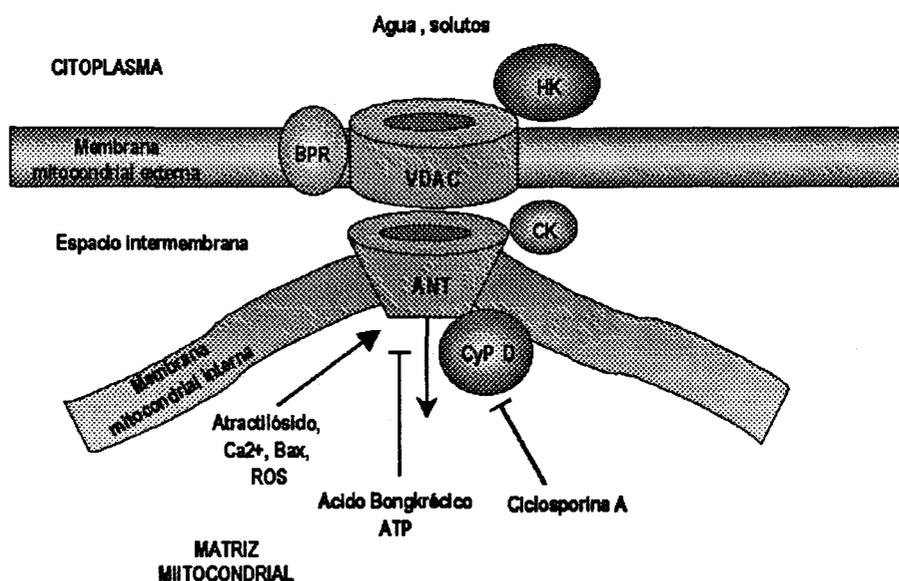


Figura 9. La unidad básica del poro responsable de la permeabilidad transitoria de la mitocondria (PT). Cuando está en configuración abierta el agua y los solutos entran en la matriz causando su hinchamiento y la posterior ruptura de la membrana mitocondrial externa. ANT, translocador de nucleótidos de adenina; BPR, receptor periférico de benzodiazepina; CK, creatinina quinasa; HK, hexoquinasa; VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje; CyPD, ciclofilina D. Inductores: Atractilósido, Ca²⁺, Bax, especies reactivas de oxígeno (ROS). Inhibidores: Ciclosporina A, Acido bongkrécico, ATP. Los inductores e inhibidores se representan de acuerdo al sitio donde actúan.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 también pueden regular la apertura del PT, en algunos sistemas celulares y en mitocondrias aisladas. Se ha observado que Bcl-2 puede prevenir la despolarización de la membrana mitocondrial mediada por el PT (198), mientras que Bax puede provocar la pérdida del $\Delta\Psi_m$, hinchamiento de la matriz y liberación de citocromo c, acciones que son inhibidas por la CsA (180,

181, 183, 195). Se ha sugerido que Bax puede iniciar la apertura del PT a través de la unión con la ANT (195).

El segundo modelo propone que los estímulos apoptóticos producen defectos en el intercambio de ADP/ATP, lo que a su vez induce el incremento del $\Delta\Psi_m$ de la MI, que transfiere cargas a la ME, produciendo el cierre del canal de VDAC (174); esta acción inicia la hiperpolarización de la ME seguida del hinchamiento de la matriz mitocondrial y la ruptura de la ME. Estas acciones pueden ser controladas por Bcl-2 que actúa como ionóforo facilitando que el potencial eléctrico transmembrana se disipe a través de la ME (174, 199).

2. La teoría de la formación de canales conductores de citocromo c.

Según esta teoría la liberación de proteínas desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma se realiza a través de canales formados por proteínas solubles en la ME. Se han propuesto tres modelos. El primer modelo se basa en la capacidad que tienen las proteínas de la familia de Bcl-2 para formar canales. La proteína Bax o proteínas relacionadas a Bax son los candidatos por excelencia para formar canales que permitan la liberación de proteínas del espacio intermembrana. Se ha observado que los oligómeros de Bax pueden formar canales grandes en las bicapas lipídicas (109, 110). Además la adición de Bax directamente a mitocondrias aisladas inicia la liberación de citocromo c a través de un mecanismo insensible a la inhibición del PT (179) y no involucra el hinchamiento mitocondrial (178) (Figura 8c). También se ha observado que los canales formados por Bax pueden ser prevenidos por Bcl-2 (109).

Un segundo modelo propone que Bax y t-Bid, pero no Bcl-X_L, pueden alterar la estabilidad de la ME por disminución de la tensión de la bicapa lipídica (200), la que puede promover la formación de poros lipídicos o complejos lípidos-proteínas grandes que facilitan la difusión de proteínas al citoplasma (Figura 8e).

El tercer modelo propone la colaboración entre Bax y VDAC para formar un canal grande que permita la conducción de citocromo c (201)(Figura 8d). Cuando VDAC es reconstituido en liposomas Bax y Bak promueven la apertura del canal, mientras que Bcl-X_L facilita su cierre (201)

En resumen, la teoría de la formación de canales ofrece la ventaja de que la funcionalidad de las mitocondrias se mantenga durante el tiempo necesario para la activación de caspasas, ya que se necesita ATP para esta etapa.

2.5. El Óxido Nítrico y el control de la Apoptosis.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso pequeño relativamente estable que difunde fácilmente a través de las membranas celulares y puede reaccionar directamente con diversos blancos moleculares. Los efectos que resulten de esta reacción dependerán de factores como el tipo celular, la concentración de NO, el tiempo de exposición y la composición del entorno (tanto extra como intracelular). En lo que se refiere a la acción del NO sobre la apoptosis, se ha encontrado que altas concentraciones de NO la inducen y bajas concentraciones la previenen. A lo largo de este apartado vamos a revisar ambos efectos.

2.5.1. Formación de Óxido Nítrico.

El NO se produce en una reacción que involucra la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidinio terminal de la L-arginina para formar cantidades estequiométricas de NO y citrulina, que está catalizada por las isoenzimas de la NO-sintasa (NOS) (202). La reacción necesita como co-sustratos, oxígeno y NADPH y numerosos cofactores redox, tales como la unión de la enzima a grupos hemo, tioles reducidos, FAD, FMN y tetrahidroxipterina. Actualmente se conocen tres isoformas de NOS. La NOS neuronal (también conocida como ncNOS o NOS1) se expresa en células neuronales; la NOS endotelial (ecNOS o NOS3), que se expresa en células endoteliales. Ambas isoformas son constitutivas y se sintetizan como monómeros que dimerizan y ganan actividad en presencia de altas concentraciones de calcio y por interacción con la calmodulina (203). La NOS inducible (iNOS, macNOS o NOS2) es una isoforma inducible que está ausente en las células en condiciones normales, es fuertemente inducida por las citoquinas y otros estímulos inmunológicos y está sujeta a regulación a nivel transcripcional y postranscripcional por diversas moléculas y vías de transducción de señales: Jak 1/Stat1 α /IRF-1; I κ B/NF- κ B; MAPK (mitogen-activated protein kinase), proteína quinasa C (PKC), PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase), proteína tirosina fosfatasa y proteína fosfatasa 1 y 2A (revisadas en 204, 205).

En general se puede decir que las pequeñas cantidades de NO requeridas para el normal funcionamiento del sistema vascular y del sistema nervioso son producidas por las isoformas constitutivas (NOS1 y NOS3), mientras que en condiciones patológicas, como por ejemplo en inflamaciones, se producen cantidades elevadas de NO después de la expresión de la isoforma inducible (NOS2). Las NOS pueden ser inhibidas por

diversas sustancias farmacológicas, tales como el N^G-monometil-L-arginina (NMMA), que se utiliza habitualmente para confirmar si los efectos se deben al NO producido endógenamente o a efectos colaterales provocados por el agente inductor (206). La NOS2 es muy activa en macrófagos inmunológicamente activados con Interferón- γ (IFN γ) y liposacáridos (LPS) (207), también en células RIN estimuladas con IL-1 β (208).

Para estudiar las acciones del NO sobre los sistemas de transducción de señales en la célula, se utilizan compuestos donadores de NO que presentan gran variabilidad en su estructura química, estabilidad y actividad biológica. De ahí que la utilización de uno u otro donador deba ser evaluado con extremo cuidado para minimizar los efectos colaterales. Son ejemplos de donadores de NO: nitratos orgánicos, nitroprusiato de sodio (SNP), 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), S-nitrosotioles (por ejemplo S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamina, SNAP, S-nitrosoglutation, GSNO) y los compuestos que tienen un grupo funcional N(O)NO⁻, comúnmente llamados NANOatos (por ejemplo DEA/NO, DETA/NO, DPTA/NO, PAPA/NO, SPER/NO y SULFI/NO).

2.5.2. Señalización del Óxido Nítrico.

El NO es una importante molécula de señalización que puede afectar a muchos tejidos y regular diversos procesos fisiológicos, como la relajación de músculo liso, la activación de plaquetas, la función neuronal o la apoptosis (209-214). Han sido descritos diversos mecanismos por medio de los cuales el NO realiza estas funciones, tales como la S-nitrosilación de grupos tioles de las proteínas, la formación de especies reactivas de oxígeno como el peroxinitrito, la estimulación de la ADP-ribosilación y la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) (84, 215-218). La sGC cataliza la conversión de GTP a GMP cíclico (GMPc) que actúa como segundo mensajero mediante la activación de las proteínas quinasas que son dependientes de nucleótidos cíclicos (218). El incremento de GMPc produce la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) y regula las vías de señalización en las que están involucradas ambas enzimas. Las acciones a través de la PKG son revisadas con detalle más adelante.

Además se ha descrito que algunos efectos del NO, incluyendo la activación de la expresión de genes y la apoptosis pueden ser mediadas por la activación de las MAPK (219-225). Las MAP-quinasas incluyendo la ERK (extracelular signal-regulated kinase), la JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) y la p38 representan una familia de

proteínas que son activadas por fosforilación de quinasas anteriores en la vía de señalización; las quinasas anteriores son llamadas MEKs, que son activadas en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas o varias formas de estrés celular (226-228). En células endoteliales se ha encontrado la activación de ERK por el NO, a través de la fosforilación y activación de cRaf por la PKG (229), aunque en otro tipo de células se ha observado que la fosforilación de cRaf por la PKG previene su acoplamiento con Ras y de esta manera inhibe la activación de ERK inducida por factores de crecimiento (230). Así, es probable que la activación de la vía de las ERK por el NO sea usando una combinación de ambas acciones.

A pesar de las diversas investigaciones realizadas hasta ahora, las acciones que llevan a la activación de JNK o p38 MAP-quinasa por el NO no están muy claras (220, 221, 225, 231, 232). Se ha propuesto que la p38 MAPK puede ser activada por el peroxinitrito a través del mecanismo de S-nitrosilación de grupos tioles de las proteínas (231). Recientemente se ha descrito que la activación de la p38 MAPK por el NO es dependiente de la activación de la PKG (233).

Por otro lado, se ha descrito que bajas concentraciones de NO activan los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (234, 235) y la ATPasa Na^+/K^+ en músculo liso (236). Sin embargo, altas concentraciones de NO inhiben la ATPasa Na^+/K^+ neuronal (237), los canales de K^+ voltaje dependiente y de Ca^{2+} (238, 239) y la H^+ ATPasa de las vesículas sinápticas de cerebro (240).

El NO altera la configuración de las estructuras denominadas dedos de zinc muy frecuentes en las proteínas reguladoras que se unen al ADN. La liberación de los átomos de zinc de sus grupos tioles conduce a la pérdida de unión de estas proteínas a sus secuencias de ADN o ARN (241). El NO inhibe la unión de NF- κ B por inducción de I κ B α (242, 243) y de AP-1 a sus respectivas secuencias específicas en el ADN (244). El NO también actúa directamente a nivel del genoma, causando desaminación de las desoxirribonucleótidos (245), roturas de las hebras del ADN en regiones ricas en CG, aumento de transiciones CG/TA e inhibición de enzimas de reparación (246, 247).

2.5.3. Apoptosis inducida por el Óxido Nítrico.

Elevadas concentraciones de NO producido tras la inducción de la NOS2 o concentraciones superiores a 100 μ M de los diversos donadores de NO provocan apoptosis en diversos sistemas celulares. El papel del NO en la apoptosis fue

confirmado utilizando inhibidores de la NOS como el NMMA que cancela los efectos de moléculas inductoras de la NOS2, cultivando las células en medio deficitario en L-arginina o tras exposición de las células a NO gaseoso (248). Los primeros datos que confirman que el NO endógeno induce apoptosis corresponden a los estudios realizados en fibroblastos de ratones L929 activados con citoquinas (249). Posteriormente se publicaron numerosos trabajos confirmando la capacidad del NO para producir apoptosis en diferentes sistemas celulares, tales como líneas celulares de macrófagos (250, 251), células beta o sus correspondientes líneas celulares tales como RINm5F y HIT-15T(164, 252-256), timocitos (257, 258), condrocitos (259), células mesangiales (260), neuronas (261, 262), mastocitos (263), células endoteliales vasculares (264), células de músculo liso (265), varias células tumorales (266) y muchas más. Muchos de estos estudios no discriminan claramente entre apoptosis y necrosis.

La inducción de la NOS2 en células RINm5F por la IL-1 β y la combinación de citoquinas, IL-1 β , INF γ y TNF α , producen alteraciones morfológicas y bioquímicas típicas de la apoptosis (164, 252, 256) tales como la condensación de la cromatina, fragmentación de ADN, activación de caspasas, liberación de citocromo c mitocondrial, degradación de PARP y degradación de Bcl-2 (164). Estas alteraciones fueron prevenidas por el NMMA, confirmando de ese modo que la apoptosis es inducida por la generación de NO. Nosotros hemos mostrado que diversos donadores de NO, tales como el SNP, SNAP, SIN-1 inducen la aparición de las alteraciones típicas de apoptosis (164). Consistente con estos resultados la integridad de la membrana plasmática, medida mediante la liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo, no se corresponde con la muerte por necrosis (164).

Se ha mostrado que el gen supresor de tumores p53 es un elemento clave en la vía activada por el daño al ADN (267), dependiendo de la magnitud de éste daño, la p53 induce la detención del crecimiento celular o la apoptosis. En células RINm5F se ha establecido que la activación de NOS2 causa un incremento en la concentración de P53 que precede a la fragmentación de ADN. La inhibición de NOS2 bloquea estos efectos. Además, tanto en células RIN como en células RAW 264.7, la cantidad de P53 se incrementa en presencia de donadores de NO (268). Las células RAW transfectadas establemente con plásmidos que codifican para el RNA antisentido de p53, muestran una menor respuesta al GSNO y una marcada reducción de la

fragmentación de ADN (269). Estas observaciones sugieren que P53 participa en los mecanismos de la inducción de apoptosis por el NO.

La primera evidencia de que las caspasas son activadas en la apoptosis inducida por el NO se puso de manifiesto en los trabajos realizados sobre la degradación PARP, un conocido sustrato de caspasa 3 (270). Otra evidencia fue que la apoptosis inducida por NO es cancelada por los inhibidores de caspasas (271). Posteriormente mediante técnicas de medición de la actividad enzimática con el uso de sustratos fluorogénicos o cromogénicos y la detección del procesamiento de las procaspasas por inmunodetección, confirmó la activación de las caspasas por el NO en diversos sistemas celulares que incluyen, macrófagos, timocitos, células pancreáticas y neuronas (164, 262, 272).

Otro efecto importante del NO que está relacionado con la apoptosis, es la acción directa que ejerce sobre la mitocondria. Está establecido que la exposición de diferentes sistemas celulares y de mitocondrias aisladas a donadores de NO (SNP, SNAP, SIN-1, GSNO) produce cambios en la mitocondria, sensibles a la CsA, tales como la apertura del PT, el hinchamiento de la mitocondria y la liberación de citocromo c (164, 273-275). Sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos que dan como resultado estos cambios. Las posibilidades son múltiples, como por ejemplo, el efecto directo del NO sobre la activación del PT, la formación de peroxinitrito un conocido activador del PT, la nitrosilación de proteínas relacionados con el control del PT. Se ha mostrado que el NO disminuye el potencial de transmembrana, por la inhibición reversible de la respiración mitocondrial, produciendo la modulación transitoria del PT (276); esta acción es coincidente con los mecanismos indicados anteriormente de apertura del PT.

Recientemente, los hallazgos de que las mitocondrias producen NO a través de la NOS mitocondrial (mtNOS), facilitan el estudio de esta situación mediante experimentos *in vivo* (277, 278). El incremento de calcio en la matriz mitocondrial está relacionado con el incremento de la síntesis de NO por la mtNOS, la inducción de la liberación de citocromo c, y por ende apoptosis. Estas acciones fueron contrarrestadas con inhibidores de la NOS, con superóxido dismutasa y con secuestradores de peroxinitrito, indicando que el peroxinitrito es un mediador de la acción del NO sobre la mitocondria. (279). Otro aspecto de la acción del NO sobre la mitocondria es su acción sobre las proteínas de la cadena respiratoria, ya que se ha descrito por un lado que los inhibidores de la cadena respiratoria inducen apoptosis de manera independiente

del PT y por otro lado se ha encontrado que el NO endógeno y exógeno puede inhibir la respiración mitocondrial debido a que compite por el oxígeno con la citocromo c oxidasa(280-282). Además, la exposición durante un tiempo prolongado a altas dosis de NO produce una continuada disminución de la respiración debido a la inhibición irreversible redox-dependiente del complejo I. Esta inhibición está precedida de un descenso en la concentración de GSH, por lo que está relacionada con la nitrosilación de grupos tioles relevantes para el funcionamiento del complejo I. La inhibición del complejo IV antes mencionada también ocurre, pero es reversible cuando se neutraliza el NO (283). De la interpretación de estos datos se puede concluir que en la apoptosis inducida por el NO, los cambios mitocondriales desempeñan un papel central, y que los mecanismos involucrados, llamense acción directa sobre el PT, acción a través del peroxinitrito o acción a través de la inhibición de la cadena respiratoria pueden estar actuando conjuntamente.

La apoptosis inducida por el NO se asocia también con una disminución de la concentración de Bcl-2 (164, 284). Aunque no se ha determinado los mecanismos implicados en este fenómeno, se sabe que la sobreexpresión de Bcl-2 previene la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO (285, 286) y que, el NO incrementa la concentración de la proteína proapoptótica Bax (287, 288). En la Figura 10 se resumen los principales pasos de la inducción de apoptosis por el NO.

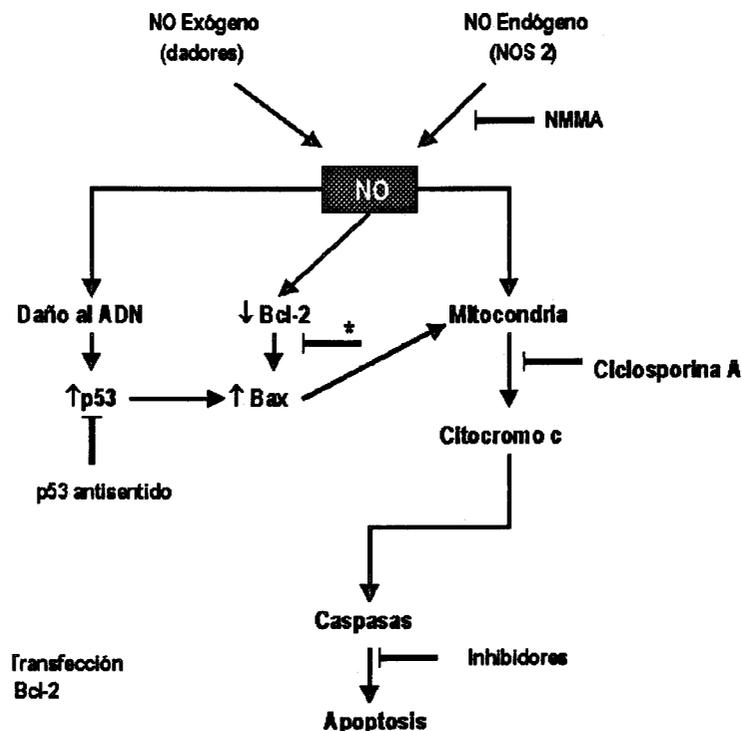


Figura 10. Apoptosis mediada por NO. El diagrama presenta todas las posibilidades encontradas en las referencias bibliográficas de como el NO puede inducir apoptosis. Algunos pasos de estas vías pueden ser inhibidos.

2.5.4. El Óxido Nítrico como protector de Apoptosis.

Existen diversas evidencias de que bajas concentraciones de NO protegen a las células de la apoptosis inducida por la retirada de factores de supervivencia y otros estímulos (289-293). El efecto antiapoptótico del NO ha sido estudiado en hepatocitos (294, 295), esplenocitos (296), células endoteliales (297), neuronas (298, 299), linfocitos B humanos (300), miocitos cardíacos (301), folículos ováricos (302) y eosinófilos humanos (303).

Los mecanismos hasta ahora propuestos para explicar el papel antiapoptótico del NO son dos: a) regulación de la actividad de las proteínas por modificación directa de su estructura por oxidación o S-nitrosilación y b) regulación de la expresión de genes que tienen funciones antiapoptóticas, como la Bcl-2, las proteínas de choque térmico, la SOD y la ciclooxigenasa 2.

a. Control de la actividad de proteínas.

Existe un conjunto de evidencias que indica que el NO modifica a las caspasas mediante la S-nitrosilación del residuo de cisteína del sitio catalítico, siendo esta acción dependiente de las condiciones reductoras del sistema de reacción (84, 85, 294, 297, 304). La mayoría de estos estudios se han realizado con extractos de células o con caspasas purificadas, de ahí que aún sea desconocido si el NO endógeno inhibe las caspasas in vivo, con excepción de los hepatocitos donde se ha visto que el NO es capaz de inhibir alrededor del 50 % de la actividad de caspasas in vivo (294) y en células endoteliales (HUVEC), donde se encontró que los donadores de NO producen la inactivación de la caspasa 3 por S-nitrosilación del residuo de cisteína 163 (305).

Un mecanismo alternativo de inhibición de las caspasas implicaría acciones del NO en la señalización molecular que pone en marcha el proceso apoptótico. En este sentido, se ha descrito que la vía clásica de señalización del NO a través de la activación de la sGC participa en la respuesta antiapoptótica (299, 306), aunque no se conocen los mecanismos ni tampoco los blancos celulares que esta vía utiliza. Por otro lado, se ha encontrado que tanto el NO como el peroxinitrito pueden activar a miembros de la familia de c-Src tirosina quinasas (307, 308), y que la c-Src puede activar a la PKG por mecanismos de fosforilación (309), lo que plantea una vía de señalización que converge con la vía clásica.

b. Regulación de la expresión de genes.

En determinadas condiciones, generalmente a bajas concentraciones, el NO protege de la apoptosis incrementando la expresión de algunos genes, tales como Bcl-2, proteína de choque térmico 70 (Hsp70), superóxido dismutasa (SOD), y ciclooxigenasa 2. Se ha mostrado que bajas concentraciones de NO protegen a los esplenocitos de la apoptosis mediante el incremento de la expresión de Bcl-2, acción que es dependiente de GMPc (296). Posteriormente se han descrito varios sistemas en donde el NO protege de la apoptosis mediante este mecanismo, por ejemplo, la protección de la apoptosis inducida por UV en células endoteliales de aorta (310), la inhibición de la apoptosis inducida por el LPS en células endoteliales de la arteria pulmonar (291) y por señales redox en células mesangiales (311).

La sobreexpresión de la Hsp70 inducida por el NO protege a los hepatocitos de la apoptosis inducida por el TNF α (312) y de la apoptosis mediada por el LPS en células endoteliales (313). Un papel activo en la protección de la apoptosis de las proteínas de choque térmico, la Hsp 70 y la Hsp 90, ha sido descrito recientemente. Ambas proteínas regulan negativamente el complejo apoptosoma a través de la interacción con los dominios CARD de la Apaf-1, previniendo así su oligomerización y la posterior activación de caspasa 9 (73, 74, 75).

Se ha observado que la sobreexpresión de la SOD inhibe la apoptosis inducida por el LPS. Sin embargo son contradictorias las informaciones respecto a si el NO induce el incremento de su expresión (291). La ciclooxigenasa 2 es inducida por concentraciones fisiológicas de NO en macrófagos y en células endoteliales, en macrófagos se ha visto la sobreexpresión de la ciclooxigenasa 2 por el NO, que es crítica en la apoptosis inducida por la combinación de LPS e INF γ (revisado en 248)

2.6. La c-Src y el control de la Apoptosis.

Las proteínas tirosinas quinasas regulan gran número de respuestas celulares como las respuestas a factores de crecimiento, agregación plaquetaria, adhesión celular y movilidad celular (revisadas en 314, 315, 316). Los miembros de la familia de Src incluyen a: c-Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck, Blk, y Bsk/lyk. En la Tabla 5 se muestran algunas de sus características.

Tabla 5. Miembros de la familia de la Src tirosina quinasa

Src tirosina quinasa	Peso Molecular (kDa)	Expresión en tejidos
c-Src	60	Amplia distribución
Yes	62	Nervioso, gastrointestinal
Fgr	59	Monocitos
Fyn	55	Células T, nervioso
Lck	56	Células T
Lyn	53, 56	Células B, Células mieloides
Hck	55	Células mieloides
Blk	55	Células B
Bsk/lyk	60	gastrointestinal

2.6.1. Estructura y regulación de la c-Src.

La c-Src (p60^{c-Src}) es una proteína tirosina quinasa que no necesita de receptores para activarse y está ampliamente distribuida en las células y tejidos. Al igual que los demás miembros de esta familia presenta una organización estructural similar, formada por segmentos comunes a los que se llaman dominios de homología a Src (SH) (Figura 11). El segmento N-terminal presenta una secuencia de 7 aminoácidos que son susceptibles de miristoilarse y permiten que la proteína pueda asociarse con la membrana plasmática (316, 317, 318), y una secuencia de 50 a 80 aminoácidos llamado el dominio único; esta secuencia es la que varía entre los miembros de la familia. A continuación la proteína presenta dos dominios de interacción con otras proteínas ajenas a la familia, los dominios SH2 y SH3; los dominios SH3 interaccionan con secuencias específicas ricas en prolina (319), y se ha propuesto que su unión a proteínas como Nef regula la actividad de la quinasa (320). El dominio SH2 interacciona con residuos de tirosina fosforilados de otras proteínas en una secuencia consenso pYEEI (318). Por otro lado, el dominio SH2 se une al residuo Tyr 527 fosforilado del extremo C-terminal de la quinasa SH1 y regula la actividad de la enzima (319). El extremo C-terminal contiene el dominio SH1 o dominio de quinasa y un segmento corto que incluye el residuo Tyr 527 que es crítico en la regulación de la quinasa. Ciertos residuos del dominio quinasa están altamente conservados en todos los miembros de la familia y son importantes para unirse al ATP y para la reacción de transferencia del grupo fosfato. La mutación de estos residuos pueden inactivar la quinasa, que entonces se comporta como dominante negativo (318). Otros residuos del dominio de quinasa contribuyen en la eficiencia enzimática, en particular, el sitio de autofosforilación localizado en una región llamada lazo de activación, que contiene

residuos fosforilados cuando la quinasa está activa. La mutación del sitio de autofosforilación disminuye la actividad quinasa (318). Las mutaciones en los residuos 378 o 441 hacen que la quinasa sea activa constitutivamente (321), aunque el mecanismo de esta activación no está bien estudiado.



M: Extremo N-terminal miristoilado, requerido para la asociación con membrana

Domínio Único varía entre los miembros de la familia de Src.

SH3: Dominio de interacción a proteínas, se une a hélices ricas en prolina.

Es requerida para la represión de la actividad de la c-Src quinasa.

Es importante para la localización sub-celular de la c-Src activada.

Es requerido para la señalización de los factores de crecimiento.

SH2: Dominio de interacción a proteínas, se une a residuos de tirosina fosforilados.

Se une al residuo Tyr 527 y participa en la regulación intramolecular.

Se une a receptores activados de PDGF y CSF-1, sitio de autofosforilación de Fak

Dominio de Quinasa: Contiene el sitio catalítico de la enzima

En el lazo de activación presenta un sitio de autofosforilación, el residuo Tyr 416 necesario para la regulación de la actividad quinasa.

Y527: Tirosina reguladora que interacciona con el dominio SH2 requerida para la represión de la c-Src quinasa

Figura 11. Diagrama lineal de la estructura de la c-Src. Los distintos motivos mostrados se encuentran en todos los miembros de la familia de Src tirosina quinasa

La actividad de la c-Src quinasa está finamente controlada por la fosforilación del residuo de tirosina 527, la enzima se encuentra en estado inactivado cuando este residuo está fosforilado e interacciona con el dominio SH2(319). La inactivación de la enzima por la fosforilación de Tyr 527 es realizado por la tirosina quinasa no receptor Csk (celular Src kinase) (322). La activación de la enzima se produce por la desfosforilación de este residuo y su separación del dominio SH2, la desfosforilación la realiza una fosfotirosina fosfatasa (319, 322); el cambio conformacional producido por la desfosforilación de Tyr 527, hace que el residuo de Tyr 416 ubicado en el lazo de fosforilación sea susceptible de autofosforilarse (323). La regulación de la actividad de la quinasa por el desplazamiento del dominio SH3 ha sido descrita; la unión de la proteína Nef al dominio SH3 produce un cambio conformacional que interrumpe su interacción con el dominio quinasa y esta acción incrementa la actividad catalítica de la enzima (320). También se ha descrito que la interacción del dominio SH3 con un anticuerpo específico para esta región, por ejemplo el anti-c-Src clon 327, induce un

incremento de la actividad de la enzima (324). En la Figura 12 se resumen los mecanismos de regulación de las Src tirosina quinasas. Por otro lado, la v-Src quinasa que carece de una porción del extremo C-terminal que contiene la Tyr 527, está permanentemente activada y está asociada a un crecimiento celular ilimitado.

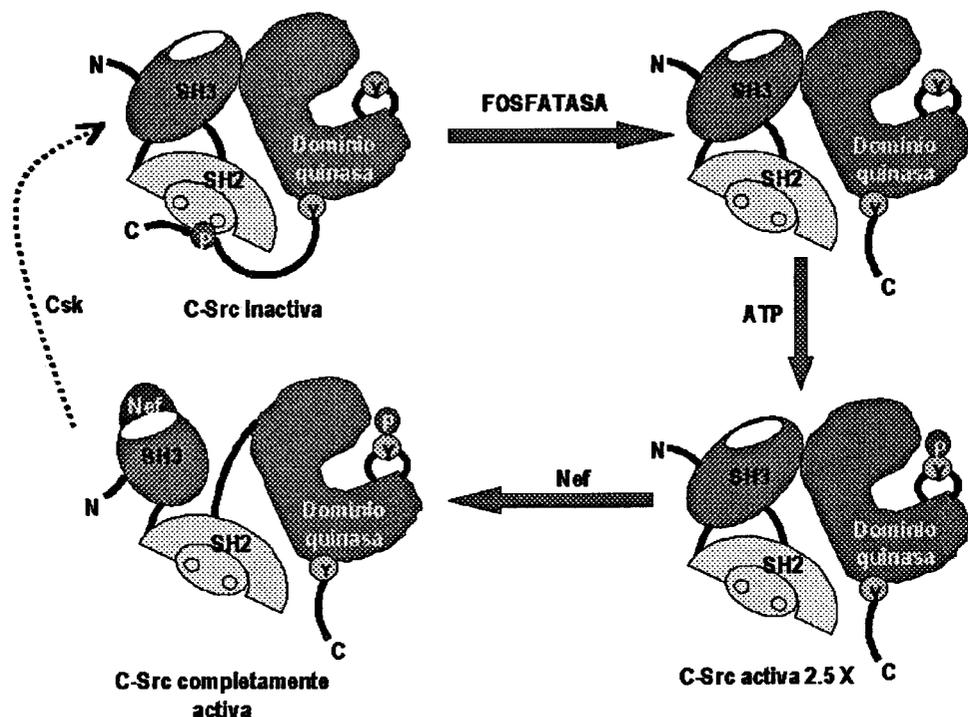


Figura 12. Modelo de activación de las Src tirosina quinasas. Las Src tirosinas quinasas están activas o inactivas dependiendo de las asociaciones intramoleculares de sus dominios. Las asociaciones son principalmente entre el dominio quinasa y los dominios SH2 y SH3. En la Src en estado inactivo las interacciones ocurren entre el dominio quinasa y el dominio SH2 a través del residuo de Tyr 527 fosforilado y entre el dominio quinasa y el dominio SH3. En el estado parcialmente activado se interrumpe la interacción entre el dominio quinasa y el dominio SH2, debido a que la desfosforilación del Tyr 527 previene esta interacción y el residuo Tyr 416 es susceptible a fosforilarse. En el estado completamente activado una interacción del dominio SH3 con otra proteína (Nef) interrumpe la interacción de SH3 con el dominio quinasa (este último mecanismo se llama activación por desplazamiento del dominio SH3).

2.6.2. Las Src tirosina quinasas y la regulación de la Apoptosis.

Es poco lo que se conoce acerca de la participación de las Src tirosina quinasas en la regulación de la apoptosis. Se ha descrito que la activación de algunos miembros de la familia, tales como Fyn y Bsk/lyk inhiben la proliferación celular. Por el contrario, otros miembros como c-Src promueven la proliferación celular y tienen función antiapoptótica. Así, se ha mostrado que existe una relación entre la inhibición de la c-Src, la disminución de la expresión de Bcl-X_L y la apoptosis. La c-Src regula positivamente la expresión de Bcl-X_L a través de la activación de la Stat 3 y actúa como potente proteína antiapoptótica (325). En otro artículo se muestra que la activación de la c-Src por la IL-3 regula la activación de Stat-3 por fosforilación y que la expresión de dominantes negativos de c-Src produce un bloqueo de la fosforilación de

Stat-3 y una dramática inhibición de la proliferación celular; sin embargo no se ha observado inducción de apoptosis por la expresión del dominante negativo (326). Por otro lado, se ha mostrado que un miembro de la familia de la Src, la p59FYN es un sustrato de la caspasa 3 en la apoptosis inducida por FAS_L; la hidrólisis ocurre en el extremo N-terminal entre el Asp19 y la Gly 20 de la p59FYN y está acompañada de la aparición de una quinasa p57FYN activa en el citoplasma; no está claro si estas acciones puedan tener un papel importante en el control de la apoptosis inducida por FAS_L (327). Recientemente se ha encontrado que un nuevo miembro de las Src, la Bsk/lyk tirosina quinasa, participa en el control de la proliferación celular, cuando las células RINm5F y NIH3T3 son transfectadas con mutantes en los residuos de tirosinas reguladores Y407/Y504 de la Bsk/lyk se observó una disminución de la proliferación celular (328, 329). Por otro lado los datos que la c-Src es activada por irradiación con luz UV (330) y que participa en la activación de la BMK1 (big mitogen activated protein kinase 1) por el H₂O₂ (331) y por estimulación de las células endoteliales con presión continua (332), indican que puede existir una relación entre la activación de la c-Src y la respuesta a estímulos que producen la muerte de las células por apoptosis.

Además, el hecho que la c-Src pueda inducir un incremento de hasta 10 veces de la actividad de la PKG, mediante mecanismos de fosforilación sin producir cambios en sus propiedades de unión al GMPc, hace pensar que la c-Src promueva un mecanismo paralelo de activación de la PKG que pueda ser adicional a la producida por GMPc. Es importante mencionar que cuando la PKG sé autofosforila su actividad basal se incrementa dos veces y disminuye su capacidad de unión al GMPc (309), lo que representa una acción diferente de la promovida por la c-Src.

2.7. La proteína quinasa c-GMP dependiente (PKG)

La PKG aparece como una proteína quinasa importante en la transducción de señales. En tejidos de mamíferos se encuentran dos grandes grupos de isoenzimas de la PKG, denominadas PKG tipo I y PKG tipo II, que resultan de la expresión de dos genes diferentes. La PKG-I tiene al menos dos isoformas llamadas I α y I β . Estas isoformas son el producto del corte y empalme alternativo del ARN mensajero (333); el grado de identidad de ambas isoformas es del 91 % (334).

Las PKG tipo I α y tipo I β son enzimas dimericas que contienen dos subunidades idénticas de aproximadamente 78 kDa. Cada uno de estas subunidades presentan diversos dominios con funciones bien definidas (Figura 13). El componente regulador

está localizado en el segmento aminoterminal de la PKG, que incluye el dominio de dimerización, el dominio autoinhibitorio conteniendo múltiples sitios de autofosforilación y dos sitios homólogos de unión a GMPc que están distribuidos en tándem. Los sitios de unión al GMPc en la secuencia primaria están seguidos por el componente catalítico, que contiene sitios de unión para Mg ATP y para la proteína sustrato (335). Las secuencias de aminoácidos de los tipos de isoformas difieren sólo en alrededor de los 100 residuos aminoterminales, donde muestran el 36 % de identidad (333). Aunque en los sitios de unión al GMPc de las PKG α y β tienen idénticas secuencias de aminoácidos, las dos isoformas muestran diferentes propiedades de unión al GMPc, lo que sugiere que la porción aminoterminal participa en la unión del nucleótido cíclico. La unión del GMPc a la PKG produce distintos cambios conformacionales en la enzima que se evidencia por un incremento de la electronegatividad de su superficie, una ampliación de su radio de Stokes, una disminución de su movilidad en electroforesis en gel nativo y una alteración de su susceptibilidad a las proteasas (333). Estos efectos están aparentemente asociados con un cambio conformacional que ayuda a la interacción del dominio autoinhibitorio con el sitio catalítico y a la activación de la proteína quinasa.

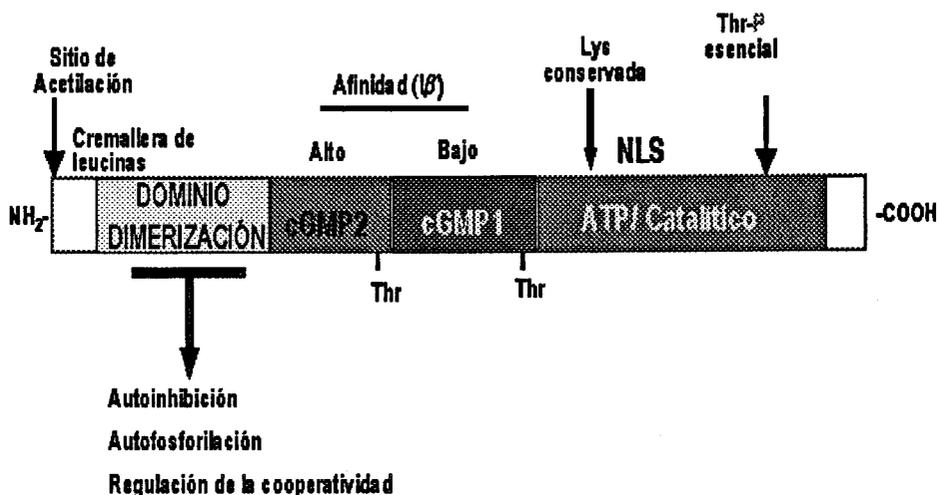


Figura 13. Estructura lineal de la PKG α de mamíferos, mostrando los dominios que se han identificado

Muchas proteínas quinasas sufren autofosforilación y éste proceso afecta a las propiedades cinéticas de cada enzima (336). Las PKG tipo α y β son autofosforiladas en o cerca de los dominios autoinhibitorios, incrementándose la actividad de la quinasa (337); el mecanismo de autofosforilación es desconocido. La activación por autofosforilación de la PKG β produce cambios similares a los producidos por la unión del GMPc.

La regulación de la apoptosis por la PKG no ha sido directamente estudiada. Los trabajos descritos anteriormente de que algunos estímulos que inducen o previenen la apoptosis están mediados por el sistema sGC/PKG han sido realizados utilizando inhibidores de las éstas enzimas, no se ha precisado la participación directa de la PKG en ambas respuestas, a excepción de lo descrito en células RINm5F de que la apoptosis inducida por el NO es independiente del sistema sGC/PKG, donde se presentan mediciones de la actividad de la PKG (164). Por otro lado, ha sido descrito que el efecto apoptótico del NO en células musculares lisas depende de un mecanismo dependiente de GMPc (338).

3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este trabajo de tesis se han estudiado los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la apoptosis por el Óxido Nítrico (NO). Cuando las células producen NO en cantidades reducidas, se pone en marcha una respuesta celular antiapoptótica. Por el contrario, cuando se producen cantidades elevadas de NO, se favorece la muerte por apoptosis. Se plantea que el NO activa un dispositivo molecular que genera señales protectoras ó de muerte dependiendo de su concentración en el interior de las células. Mientras que a bajas concentraciones se generarían sólo señales protectoras, a altas concentraciones se producirían además señales determinantes de la muerte por apoptosis que desbordarían los sistemas de protección.

Ya que el sistema de la proteína quinasa G (PKG) participa en un buen porcentaje de las acciones no letales del NO en las células, se estudiará la participación de la PKG en las acciones antiapoptóticas del NO así como su dependencia de la sGC y de la c-Src tirosina quinasa.

En función de los datos experimentales aportados en la literatura científica sobre el control de la muerte por apoptosis, se ha propuesto que el NO a altas concentraciones induce la apoptosis de las células mediante el incremento de la expresión de P53 y de Bax.. Dado que se han descritos acciones del NO sobre la cadena respiratoria y ya que la mitocondria tiene capacidad para generar NO, se propone un papel central para la mitocondria en las acciones apoptóticas del NO.

Para someter a estudio estas propuestas, se plantearon los siguientes objetivos:

3.1. Objetivos sobre el papel proapoptótico del NO

- 3.1.1. Determinar mediante el estudio de índices apoptóticos el efecto de altas concentraciones de NO sobre las células RINm5F
- 3.1.2. Estudiar el papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO
- 3.1.3. Estudiar la relación entre la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO y la vía de transducción de señales dependiente del cGMP

3.2. Objetivos sobre el papel antiapoptótico del NO

- 3.2.1. Caracterizar un sistema de apoptosis espontánea inducida por la retirada de suero del medio de cultivo
- 3.2.2. Estudiar la acción antiapoptótica del NO
- 3.2.3. Caracterizar un nuevo índice de medición de apoptosis/antiapoptosis llamada actividad Bcl-2 quinasa.
- 3.2.4. Estudiar el papel de la cSrc tirosina quinasa y la proteína quinasa dependiente de cGMP en la respuesta antiapoptótica inducida por el NO

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico que se utilizó como sistema de trabajo es la variante RINm5F (gentilmente cedidas por el Dr. Decio L. Eizirik) de la línea celular continua que secretan insulina y somatostatina denominada RINm que fue establecida a partir de un cuarto heterotransplante en ratones desnudos de células tumorales de islotes de rata, los estudios de isoenzimas confirman el origen de rata de éstas células (339). Las células RINm no están contaminadas con micoplasmas y virus de leucemia murina (339). Las células RINm5F se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 2.5 mg/ml anfotericina B a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD CELULAR

Las células no viables incrementan la permeabilidad de su membrana plasmática a enzimas del citosol que son liberadas al medio extracelular, el cociente entre la actividad de estas enzimas en el medio extracelular y la actividad total de las mismas es un indicador fiable de viabilidad celular. La liberación de la actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH) se utilizó como índice de toxicidad celular y fue medida siguiendo un método espectrofotométrico mediante una reacción acoplada con la oxidación del NADH.



4.2.1. MATERIALES

- Tampón de lisis: (Tris-HCl 5 mM pH 7.0, EDTA 20 mM, Triton X-100 al 5 %),
- NADH 4 mM
- Pirúvato 32 mM
- Placas de cultivo de 12 pocillos
- Espectrofotómetro que permita leer la densidad óptica a 340 nm

4.2.2. PROCEDIMIENTO

Se sembraron 5 x 10⁴ células en 1 ml de medio RPMI completo, al cabo de dieciséis horas se realizaron los tratamientos respectivos y se incubaron por los tiempos indicados

en cada experimento. Las células fueron cuidadosamente recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante tres minutos, el sobrenadante fue recuperado para analizar la actividad de LDH liberada al medio, las células contenidas en el precipitado fueron rotas en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 5 mM pH 7.0, EDTA 20 mM, Triton X-100 al 5 %), luego se centrifugadas a 15000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante donde se midió la actividad de LDH en el homogeneizado. La actividad de LDH fue medida espectrofotométricamente de la siguiente manera: En una micro cubeta de espectrofotómetro se puso 800 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.0, se añadió 50 μ l de piruvato 32 mM, 100 μ l de muestra, se incubó a 37 °C durante quince minutos, antes de leer al espectrofotómetro se agregó 50 μ l NADH 4 mM, se agitó cuidadosamente y se siguió la disminución de la densidad óptica del NADH a 340 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADH ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.3. CÁLCULO

El porcentaje de LDH liberado por las células al medio de cultivo fue calculado de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ LDH liberado} = \frac{\text{LDH en medio cultivo}}{\text{LDH en medio de cultivo} + \text{LDH en lisado celular}} \times 100$$

Para la expresión de resultados se graficaron % de LDH liberado al medio contra concentración de la sustancia con la que se realizó el tratamiento.

4.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA

La actividad metabólica de células viables se determinó utilizando el "Cell proliferation kit I (MTT)". El método se fundamenta en que la sal de tetrazolium MTT de color amarillo es reducido por la succinato-tetrazolium reductasa (E.C. 1.3.99.1) a formazan el cuál precipita en forma de cristales que al disolverse dan una solución coloreada que puede ser cuantificada en un espectrofotómetro lector de ELISA.

4.3.1. MATERIALES

- Cell Proliferation kit I (MTT) (Boheringer)
- Placa de cultivo de 96 pocillos
- Espectrofotómetro Lector de ELISA.

4.3.2. PROCEDIMIENTO

En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 5×10^3 células en un volumen de 100 μl de medio RPMI 1640 completo, se cultivo durante dieciocho horas antes de realizar los tratamientos, cuando estos terminaron el medio de cultivo fue cambiado por 100 μl medio fresco sin estímulo y se añadieron 10 μl de solución de MTT (concentración final de 0.5 mg/ml en medio de cultivo) e incubaron durante cuatro horas en atmósfera húmeda, a continuación se añadieron 100 μl de solución de solubilización e incubaron durante toda una noche en atmósfera húmeda, finalmente se midió la densidad óptica a 550 nm usando como longitud de onda de referencia 630 nm. Para los cálculos se prepara una curva de calibración entre número de células y densidad óptica.

4.4. MEDICIÓN DE PROTEÍNAS

La medición de proteínas se realizo utilizando el método de Bradford

4.4.1. MATERIALES.

- Reactivo de Bradford "BIO-RAD Protein Assay Dye Reagent Concentrate
- Albúmina Sérica Bovina 1mg/ml
- Espectrofotómetro
- Cubetas desechables de 1.5 ml.

4.4.2. PROCEDIMIENTO

Se preparan los estándares a concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$. En tubos Eppendorf se pusieron 5 μl de los estándares respectivos y se añadió 20 μl de agua, de estas diluciones se tomaron 5 μl y se pusieron en una cubeta de espectrofotómetro de 1.5 μl , se añaden 945 μl de agua desionizada y 50 μl de reactivo de Bradford concentrado, se mezcla cuidadosamente sin formar burbujas y se mide la absorbancia a 595 nm. Para la realización de los cálculos se elaboró una curva de calibración entre densidad óptica y concentración de proteínas. Para la medición de proteínas en los homogeneizados celulares se tomaron 5 μl y se diluyeron en 20 μl de agua, de esta dilución se tomaron 5 μl y se procedió como se indica en el párrafo anterior.

4.5. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GUANILATO CICLASA SOLUBLE(sGC)

La medición de la actividad de la guanilato ciclasa soluble se basa en la capacidad que tiene

la enzima en producir cGMP a partir de GTP, en un medio de reacción que contiene un sistema de regeneración de GTP y un inhibidor de la fosfodiesterasa. El cGMP generado se mide por radioinmunoanálisis.

4.5.1. MATERIALES.

- Tampón Tris-HCl pH 7.5 50 mM
- Fosfocreatinina (Sigma)
- Creatinina fosfoquinasa (Sigma)
- Guanosina 5' tri fosfato (GTP)
- 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma)
- HCl 0.05 N
- cGMP (¹²⁵I) radioimmunoassay (RIA) system (Amershan).
- Lector de radioactividad gamma.

4.5.2. OBTENCION DE HOMOGENEIZADO CRUDO.

Las células RINm5F (5×10^6 células) fueron cultivadas durante 16 horas antes de realizar los tratamientos, luego estos se realizan según se indican en cada experimento. La homogeneización de las células se realizaron en una tampón que contiene 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 1 % de nonidet 40, 25 mM MgCl₂, 2 mM de ortovanadato de sodio, 140 mM ClNa, 1 mM de DTT, y una mezcla de inhibidores de proteasas conteniendo 1 mM de PEFABLOC®, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatin, 10 µg/ml de leupeptina. Los extractos fueron centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue usado para medir la actividad de sGC.

4.5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA sGC

La actividad de la sGC fue medida como se describe en (340) Para ello se tomaron 30 µg de proteínas del sobrenadante e incubaron durante 10 minutos a 37 °C en una mezcla de reacción que contiene 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 4 mM de MgCl₂, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 7.5 mM de Fosfocreatinina, 0.2 mg/ml de Creatinina fosfoquinasa, 1 mM de Guanosina 5' tri fosfato (GTP), la reacción se llevó a cabo en ausencia o presencia de 1mM de nitroprusiato de sodio y fue detenida con la adición de 0.05 N de HCl en una proporción de 1:9 . Luego los tubos fueron calentados a 100 °C durante 3 minutos. Para la determinación de las cantidades de cGMP formado mediante la técnica de RIA los tubos fueron secados en un evaporador y suspendidos en 500 µl

de tampón de determinación para cGMP

4.5.4. DETERMINACIÓN DE Guanosina Mono Fosfato cíclico (cGMP) POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Para medir cGMP se usa un sistema de medición de Amersham (cGMP [¹²⁵I] assay system with Amerlex-M™ magnetic separation) que al ser reconstituido contiene:

- Estándar acetilado (2.56 pmol/ml en 0.05 M de tampón acetato pH 5.8).
- Guanosine 3', 5' -cyclic phosphoric acid 2'-O-succinyl 3' -[¹²⁵I] iodotyrosine methyl ester en 0.05 M de tampón acetato pH 5.8.
- Anti-cGMP preparado en conejo reconstituido en 0.05 M de tampón acetato pH 5.8
- Tampón de medición (0.05 M de tampón acetato pH 5.8)
- Anticuerpo secundario (Anti-conejo preparado en mono Amerlex-M).
- Anhídrido acético
- Trietanolamina.

Para la medición se siguió el protocolo de acetilación, para ello a 500 µl de las muestras suspendidas en tampón de medición se añadieron 25 µl del reactivo de acetilación (1 volumen de anhídrido acético con 2 volúmenes de trietanolamina), los tubos fueron agitados inmediatamente después de añadir el reactivo de acetilación. Se tomaron alícuotas de las muestras acetiladas (100 µl para muestras control y 30 µl para muestras tratadas) y se completó el volumen a 100 µl con tampón de medición, luego se añadió 100 µl de antisuero, se agitó e incubó durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se añadió 100 µl de cGMP [¹²⁵I] a todos los tubos de ensayo, se agitó e incubó por 15 horas a 4 °C. Posteriormente se añadió 500 µl de una suspensión homogénea de Anticuerpo secundario (Anti-conejo preparado en mono Amerlex-M). Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para separar la fracción de anticuerpo unido los tubos fueron centrifugados a 1500 g durante 10 minutos, y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. La radioactividad fue leída en un contador de centelleo gamma durante 60 segundos. La curva de calibración se realizó con estándar acetilado en un rango de 2 a 128 femtomoles.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNA QUINASA G (PKG)

El procedimiento para determinar la actividad de la PKG se basa en la capacidad de la enzima para incorporar ³²P proveniente de [γ -³²P] ATP en un péptido sustrato sintético específico, RKISASEFDRPLR-BPDEetide (341), en un sistema de reacción que contiene un

péptido inhibidor específico de proteína quinasa A (342) y un inhibidor de la fosfodiesterasa.

4.6.1. MATERIALES.

- Tampón Tris-HCl pH 7.4, 20 mM
- 200 μ M ATP
- Péptido sustrato de proteína quinasa G -BPDEtide (Calbiochem).
- Péptido inhibidor de proteína quinasa A 6-22 amida (Calbiochem).
- [γ ³²P]ATP 0.5 μ Ci/ μ l
- 3-isobutil-1-metilxantina-IBMX (Sigma)
- MgCl₂
- Ácido tricloroacético al 10 %
- Papel de fosfocelulosa (Whatman P-81)
- Ácido fosfórico 75 mM
- Etanol
- Lector de radioactividad beta.

4.6.2. OBTENCION DE HOMOGENEIZADO CRUDO.

Las células RINm5F (5×10^6 células) se cultivaron durante 16 horas antes de realizar los tratamientos, luego los tratamientos se realizaron según se indican en cada experimento. Las células fueron homogeneizadas en un tampón que contiene 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 1 % de nonidet 40, 25 mM MgCl₂, 2 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de DTT, 1 mM de PEFABLOC®, 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de pepstatina, 10 μ g/ml de leupeptina. Los homogeneizados fueron centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue usado para medir la actividad de PKG

4.6.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKG

El procedimiento para medir la actividad de la PKG es una adaptación del método descrito en (343). Alícuotas 10 μ l de homogeneizado conteniendo 30 μ g de proteína fueron añadidos en 50 μ l de una mezcla de reacción que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 μ M ATP, 20 mM MgCl₂, 100 μ M de péptido sustrato para PKG, 100 μ M de IBMX, 1 μ M de un péptido inhibidor de proteína quinasa A y 0.5 μ Ci/ml [γ ³²P]ATP, la reacción fue incubada a 37 °C durante 10 minutos. Para terminar la reacción, se tomaron 50 μ l de ésta y se impregnaron en un filtro de fosfocelulosa (Whatman P-81). Este filtro

fue inmediatamente lavado con 75 mM de ácido fosfórico, se repite este lavado cuatro veces, para eliminar el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que no ha reaccionado, y una vez con etanol. Los filtros se secan y posteriormente se depositan en viales conteniendo líquido de centelleo y se mide su radiactividad. La unidad de actividad de PKG se define como mM de fosfato transferido desde el ATP al péptido sustrato por minuto por mg de proteína.

4.7. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASAS.

La medición de la actividad de caspasas se basa en la extraordinaria selectividad que tienen para cortar componentes estructurales claves del citoesqueleto y núcleo, así como también numerosas proteínas involucradas en las vías de señalización, las caspasas en general cortan en secuencias de aminoácidos consenso que tienen ácido aspártico en posición P1. Por ejemplo la caspasa 3 puede cortar entre otros sustratos a la poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) en una secuencia, DEVD⁷G entre aspártico 216 y glicina 217 (344). Para la medición de la actividad de caspasas han sido diseñados péptidos sustratos sintéticos, que tienen la secuencia de aminoácidos de los motivos de corte de las proteínas sustrato naturales, que llevan conjugado una molécula fluorescente, el 7-amino-4-trifluorometil coumarin (AFC), para los casos de la caspasa 3 y la caspasa 1 son los tetrapéptidos DEVD-AFC y YVAD-AFC respectivamente (37, 24).

4.7.1. MATERIALES

- HEPES 25 mM pH 7.5 (SIGMA)
- MgCl_2 5 mM (SIGMA)
- EGTA 1 mM (SIGMA)
- Triton X-100 (SIGMA)
- PMSF (Boheringer)
- Pepstatina A (Boheringer)
- Leupeptina (Boheringer)
- Aprotinina (BAYER)
- CHAPS (SIGMA)
- DTT (SIGMA)
- DEVD.AFC (Calbiochem)
- YVAD.AFC (Calbiochem)
- 7-amino-4-trifluorometilcoumarin (SIGMA)

- Fluorímetro (Perkin Elmer LS-5)

4.7.2. PREPARACIÓN DE HOMOGENEIZADO

Las células RINm5F (5×10^6 células) se cultivan durante 16 horas antes de realizar los tratamientos. Después de los tratamientos las células se centrifugan a 700 g durante tres minutos, se lavan dos veces con PBS frío y se resuspenden en tampón C que contiene HEPES 25 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1.0 %, suplementado al momento de su uso con PEFABLOC 1 mM, pepstatina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, después de 30 minutos de incubación en hielo, las células fueron homogeneizadas en un homogeneizador con cuarenta golpes, la fracción particulada fue separada por centrifugación a 15.000 g durante quince minutos, el sobrenadante recuperado fue suplementado con EDTA 0.5 mM y DTT 2mM de concentración final, antes de realizar la determinación de caspasas.

4.7.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASAS

La determinación de la actividad de caspasas fue realizada según (36), alícuotas conteniendo 50 μ g de proteína fueron diluidas con 225 μ l de tampón D recién preparado que contiene HEPES 25 mM pH 7.4, CHAPS 0.1 %, DTT 10 mM, aprotinina 100 U/ml, PMSF 1 mM y 100 μ M de sustrato (DEVD.AFC para caspasa 3 y YVAD.AFC para caspasa 1), se incubó durante dos horas a 37 °C, la reacción fue terminada añadiendo 1225 μ l de tampón D helado. La fluorescencia fue medida en un Espectrómetro-Luminómetro Perkin Elmer LS-5 usando una longitud de onda de excitación de 400 nm con una apertura de 10 y de emisión 505 nm con una apertura de 20. Se realizó una curva de calibración con 7-amino-4-trifluorometilcoumarin como estándar entre las concentraciones de 0 a 1500 pmol.

4.8. MEDICION DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE ELISA

Una característica de la muerte celular por apoptosis es la corte de la doble cadena de ADN por nucleasas en las regiones que son accesibles como la región de unión internucleosomal, generando mono y oligonucleosomas que difunden al citoplasma. Uno de los métodos para cuantificar este ADN asociado a histonas liberado al citoplasma esta basado en un principio de ELISA usando un anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido contra ADN e histonas respectivamente. En una placa con estreptovidina se incubaba con un anticuerpo anti-histona-biotina, luego se añade la muestra problema conteniendo nucleosomas, a

continuación se incubaba con un conjugado anti-ADN unido a una peroxidasa, finalmente se cuantifica la señal añadiendo un sustrato para la peroxidasa y leyendo la intensidad de color formado por espectrofotometría.

4.8.1. REACTIVOS.

- Sistema de ensayo "Cell Death Detection ELISA^{plus}" (Boehringer Mannheim) que contienen:
 1. Anticuerpo monoclonal preparado en ratón anti-histona-biotina reconstituido en 400 μ l de agua bidestilada
 2. Anticuerpo monoclonal preparado en ratón anti-ADN-Peroxidasa reconstituido en 400 μ l de agua bidestilada
 3. Complejo estabilizado ADN-histona, como control positivo reconstituido en 400 μ l de agua bidestilada
 4. Tampón de incubación
 5. Tampón de lisis
 6. Tampón para disolución de sustrato
 7. Tabletas de sustrato ABST^o
 8. Una placa de 96 pocillos revestida con estreptovidina
- La mezcla "inmunoreactiva" para realizar 5 determinaciones se preparó de la siguiente manera:
 - 20 μ l de 1 (anti-histona-biotina)
 - 20 μ l de 2 (anti-ADN-Peroxidasa)
 - 360 μ l de tampón de incubación.

4.8.2. PROCEDIMIENTO

En placas de 12 pocillos fueron sembradas 5×10^4 células, después de 18 horas de cultivo el medio de cultivo fue retirado y cambiado por otro que contienen los respectivos tratamientos, al final de los tratamientos las células fueron recogidas en PBS, luego recuperadas por centrifugación a 300 g por 3 minutos, y suspendidas en 200 ml de tampón de lisis, se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifuga a 2.000 g por 10 minutos. A continuación se colocaron 20 μ l de muestra en los pocillos de la placa con estreptovidina, tener en cuenta que se deben hacer blancos para control positivo y para tampón de incubación más sustrato. Luego se añaden 80 μ l de la mezcla

"*inmunoreactiva*", los pocillos en uso fueron cubiertos con una cinta adhesiva e incubados durante dos horas en agitación a 500 rpm a temperatura ambiente. Luego la solución fue retirada cuidadosamente, los pocillos lavados tres veces con 250 μ l de tampón de incubación, y se añadieron 100 μ l de solución de sustrato. Se incubó durante 20 minutos en agitación a 250 rpm. El color desarrollado fue medido a 405 nm usando como longitud de onda de referencia 492 nm.

4.8.3. CÁLCULOS

El factor de enriquecimiento (FE) fue calculado mediante la siguiente formula:

$$F.E. = \frac{D.O. \times 10^3 \text{ muestra}}{D.O. \times 10^3 \text{ control}} \times 100$$

D.O. en ambos casos representa ($DO_{405} - DO_{491}$ de muestra menos $DO_{405} - DO_{491}$ del blanco de tampón de incubación más sustrato). Para la expresión de resultados se representó gráficamente FE frente a la concentración de la sustancia con la que se realizó el tratamiento.

4.9. DETERMINACION DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Al igual que en la sección 4.8 lo que se mide con esta técnica es la presencia de ADN fragmentado en mono o polinucleosomas, sólo que se realiza por electroforesis de la fracción citoplasmática en geles de agarosa, un patrón típico de apoptosis generará fragmentos de ADN en forma de escalera que corresponderán en tamaño molecular a uno o múltiplos del peso molecular de un nucleosoma (200 pb).

4.9.1. MATERIALES

- Proteinasa K (Boheringer)
- RNAasa A (Boheringer)
- SDS 10 %
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (SIGMA)
- Cloroformo
- Tampón de lisis: Tris-HCl 10 mM pH 8.2, ClNa 400 mM, EDTA 2mM.
- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM
- Etanol absoluto.
- Tampón TBE: Tris-Borato 0.09 M pH 8.2, EDTA 0.002M

- Tampón de carga de la muestra: Glicerol 30 %, Azul de bromofenol 0.25 %, azul de xilencianol 0.25 %, Bromuro de etidio 10 μ l/ml.
- Agarosa 1.4 % P/V en TBE

4.9.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó la técnica de precipitación con Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y tratamiento con proteinasa K. La proteinasa K degrada histonas y proteínas en general, la mezcla Fenol-cloroformo precipita a las proteínas y forma una interfase fácil de separar, el alcohol isoamílico disminuye la formación de espuma.

4.9.3. RECOGIDA DE CÉLULAS Y RUPTURA CELULAR.

Cuando terminaron los tratamientos respectivos se recogieron las células con la ayuda de un raspador y la suspensión celular se centrifugó a 700g durante tres minutos.

El precipitado de células fue suspendido en 700 μ l de tampón de lisis que contiene 50 μ l de SDS al 10 % y proteinasa K a una concentración final de 200 μ g/ml y se dejó incubando a 37 °C durante una noche

4.9.4. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción se añadió un volumen de la mezcla Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y agitó cuidadosamente, luego se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos, la fase acuosa fue recuperada y lavada dos veces con un volumen de cloroformo centrifugando a 2.000 g durante 5 minutos. El ADN fue precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío durante una noche a -20 °C, luego se centrifugó a 4.500 g durante 10 minutos. El ADN precipitado fue secado y luego suspendido en 100 ml de tampón TE que contiene 0,5 mg/ml de RNAasa A e incubado a 37 °C durante dos horas. El ADN libre de ARN se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío durante una noche a -20 °C, luego se centrifugó a 4.500 g durante 10 minutos, el ADN precipitado fue secado y luego suspendido en 50 μ l de tampón TE.

4.9.5. ÍNDICE DE PUREZA Y CONCENTRACIÓN DE ADN

La pureza y concentración de ADN se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. En un ADN hidratado con buen índice de purificación, el cociente A_{260}/A_{280} debe ser superior a 1,7. Una solución patrón de ADN de concentración 50 mg/ml da una lectura de absorbancia de $A_{260} = 1$, lo que permite calcular la concentración de ADN purificado.

4.9.6. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Una muestra purificada de 50 mg de ADN resuspendida en tampón TE fue mezclada con tampón de carga en una proporción 6:1. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.4 % durante una hora a 130 V. Transcurrido este tiempo el gel fue colocado en una solución de 10 µg/ml de bromuro de etidio durante 10 minutos, luego lavado una vez con agua destilada. Las señales de los fragmentos de ADN fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiadas con una cámara Polaroid.

4.10. *OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES anti-Citocromo c.*

4.10.1. MATERIALES

- Citocromo c de corazón de caballo (SIGMA)
- Hemocianina a partir de Keyhole Limpets (SIGMA)
- Adyuvante completo de Freund (SIGMA)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida - EDC (PIERCE)
- Sepharosa Proteína G (Amersham)
- Dos conejos

4.10.2. OBTENCIÓN

El anticuerpo policlonal contra citocromo c fue preparado en conejo siguiendo el método de inmunización que fue descrito previamente por (345). Se utilizó como antígeno citocromo C de corazón de caballo, como transportador se utilizó la hemocianina de Keyhole Limpets a una concentración de 5 mg/ml, para unir de manera covalente el citocromo c con la hemocianina se utilizó la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)(346). Para la preparación de la solución antigénica se procedió de la siguiente manera: a 500 µl de citocromo c (1mg/ml) se añadió EDC hasta una concentración final de 10 mg/ml, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, luego se añadió 500 µl de hemocianina y se completó a 5 ml con PBS, la mezcla se incubó durante cuatro horas en agitación a 4 °C. A continuación se dializó contra PBS durante cuarenta y ocho horas, cambiando el PBS dos veces. La muestra dializada se mezcló con un volumen igual de adyuvante de Freund completo. Luego homogeneizar la mezcla con ultrasonidos durante diez segundos, queda una solución lechosa, la que se inyectó por vía intradérmica en la

espalda del conejo en 8 a 10 puntos diferentes. Se inyectó además dos dosis de recuerdo a la tercera y octava semana de la primera inyección, para ello se siguió el mismo método salvo que se mezcló con adyuvante de Freund incompleto, que es el adyuvante de Freund al que se le eliminan los restos de paredes bacterianas por centrifugación. El suero de conejo se extrajo pasados catorce días de la última dosis de recuerdo.

4.10.3. PURIFICACIÓN

Las inmunoglobulinas G fueron purificadas utilizando cromatografía de afinidad con Sepharosa-Proteína G. Para ello un volumen de la Sepharosa-Proteína G fue lavado por tres veces con tampón fosfato 20 mM pH 7.0, y mezclado con un volumen de suero inmune, la mezcla fue incubada durante tres horas a temperatura ambiente en agitación, a continuación fue centrifugada a 700 g durante dos minutos y el sobrenadante fue descartado, el precipitado fue lavado dos veces con PBS y mezclado con medio volumen de tampón glicina 0.1 M pH 2.6, e incubado durante tres horas en agitación a temperatura ambiente, finalizado este tiempo fue centrifugado a 700 g durante dos minutos y el sobrenadante fue recuperado, finalmente se añade medio volumen de tampón Tris-HCl 1 M pH 9.0 para neutralizar la solución.

4.10.4. PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DEL ANTI-CITOCROMO C POLICLONAL PRODUCIDO EN CONEJO

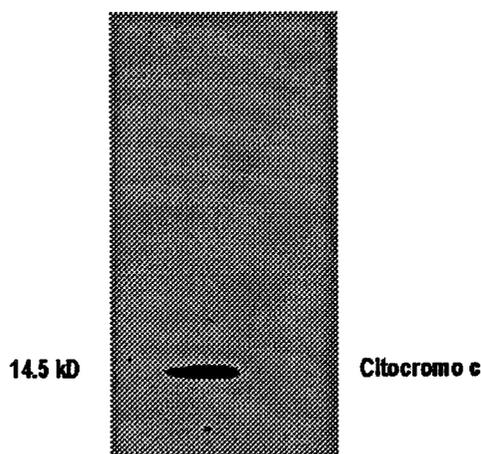


Figura 4.1 . Inmunodetección de un estándar de citocromo c detectado con anticuerpo policlonal producido en conejo. 0.01 μ g de citocromo c de corazón de caballo en 10 μ l de tampón de Laemmli fue calentado a 100 °C durante 30 minutos y corrido en una SDS-PAGE al 12.5 % y transferida a una membrana de PVDF e incubada con 5 % de leche desnatada en TBST durante una hora, luego se incubó con anti-citocromo c policlonal producido en conejo durante cuatro horas a una dilución de 1: 5.000, a continuación fue lavada 3 veces con TBST durante 10 min e incubada con un anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:20.000 durante una hora. Finalmente fue lavada 3 veces con TBS durante 10 min. La banda de inmunocomplejos fue detectada por el método de quimioluminiscencia.

4.11. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

4.11.1. MATERIALES

- Acrilamida-bis acrilamida al 30% (29.2 % de acrilamida y 0.8 % de N,N'-metileno-bis-acrilamida)
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10 %
- Persulfato de Amonio (APS) al 10 %
- N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)
- Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- Tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, SDS al 1%, Glicina 250 mM)
- Sistema de electroforesis vertical Mini-PRTEAN II (BIORAD)
- Fuente de poder.

4.11.2. PREPARACIÓN DE LOS GELES

En la electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida con SDS se utilizan un gel de apilamiento que contiene 4% de poliacrilamida y un gel de separación donde la concentración de la poliacrilamida depende del tamaño de la proteína problema, los geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones se prepararon según los siguientes protocolos:

GEL DE SEPARACIÓN (10 ml)

Reactivo	7.5 %	10%	12.5%	15%
Acrilamida-Bis. AC ¹ .	2.5 ml	3.3 ml	4.13 ml	5.0 ml
Agua desionizada	4.4 ml	3.6 ml	2.77 ml	1.8 ml
TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS 10 % (10 mg/100 µl)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5-10 µl	5-10 µl	5-10 µl	10 µl

GEL DE APILAMIENTO

Reactivo	
Acilamida-Bis. AC ¹ .	430 μ l
Agua desionizada	1.88 ml
TRIS-HCl 1.0 M pH 6.8	830 μ l
SDS 10 %	33 μ l
APS 10 % (10 mg/100 μ l)	16 μ l
TEMED	3.3-5 μ l

1. Pesar 29.2 g de acilamida + 0.8 g de bis-acilamida en un volumen final de 100 ml (Al pesar estos reactivos hay que usar guantes y mascarilla y hacerlo en la campana de flujo.
2. El pH debe verificarse en la cubeta antes de la electroforesis

Luego de montar el sistema de electroforesis, se preparó el gel separador y antes que polimerice se añade en el molde a continuación se añade cuidadosamente 1 ml de agua desionizada para evitar que el oxígeno atmosférico pueda inhibir la polimerización. Cuando se observa que el gel a polimerizado se retiró el agua y se añadió el gel de apilamiento, sobre el que se colocaron los peines para construir los pocillos de carga de muestras.

4.11.3. CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS

Para realizar la electroforesis se colocaron los geles en la cámara de electroforesis que se llenó con el tampón de electroforesis. Luego se cargó la cantidad adecuada de proteínas en los pocillos y una muestra de estándares de pesos moleculares. El sistema fue conectado a una fuente de corriente en la que se mantiene el voltaje constante a 150 V durante una hora.

4.12. TRANSFERENCIA HÚMEDA DE LAS PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF.**4.12.1. MATERIALES**

- Membranas de polyvinilidene difluoride (PVDF) - Hybond-P (Amersham LIFE

SCIENCE)

- Tampón de transferencia (Tris 48 mM pH 9.2, Glicina 39 mM, SDS 0.0375 %, Metanol 20 %).
- Papel Whatmann™ 3MM
- Sistema de transferencia húmeda - Mini Trans-Blot Electroforetic transfer Cell (BIORAD)

4.12.2. PROCEDIMIENTO

Una vez terminada la electroforesis las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF por el método de transferencia húmeda manteniendo constante la intensidad a 350 mA durante 3 horas, el tampón de transferencia debe ser recién preparado y cuando la intensidad es constante a 350 mA, el voltaje debe variar entre 70-80 V.

4.13. *INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR QUIMIOLUMINISCENCIA (ECL)*

4.13.1. MATERIALES

- Anticuerpos primarios contra las proteínas estudiadas
- Anticuerpos secundarios conjugados contra ratón, conejo, cabra.
- Tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, ClNa 137 mM)
- Tampón TBST (TBS mas 0.5 % de Tween 20)
- Tampón de saturación (leche en polvo desnatada diluida al 5 % en TBST)
- 5-amino-2-3-dihydro-1,4-phthalazinedione - Luminol (Sigma)
- 4-Iodophenol (Fluka)
- Tampón ECL (Tris 10 mM pH 8.5)
- Casette para revelado - Hypercassette™ (Amersham)
- Película - Hyperfilm MP (amersham)
- Revelador
- Fijador

4.13.2. PROCEDIMIENTO.

Después de que las proteínas fueron transferidas a las membranas de PVDF, éstas fueron bloqueadas con una solución de TBST enriquecida con leche desnatada al 5 % durante 12 horas, e incubadas con anticuerpo primario durante un tiempo y a una

dilución óptima determinados para cada anticuerpo; a continuación las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con TBST, e incubadas con anticuerpo secundario a una dilución de 1:20 000 durante una hora y lavadas tres veces durante 10 minutos con TBS.

Para la detección de los inmunocomplejos las membranas fueron incubadas con la solución incremento de la quimioluminiscencia (ECL*) durante 1 minuto. La membrana fue colocada en un "cassette" en contacto con una película por un tiempo adecuado y luego revelada. Todos los pasos en que se utilizan las películas y los líquidos de revelado se realizan en un cuarto oscuro.

*La solución ECL fue preparada mezclando un volumen de solución de luminol (4 mg de luminol en 25 μ l de NaOH 1 N y completada a 5 ml con tampón ECL) con un volumen de la solución de yodofenol (1 mg de yodofenol en 5 ml de tampón ECL), a las que fue añadida 10 μ l de H₂O₂ concentrado según (347).

4.14. DESPEGADO DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS.

4.14.1. MATERIALES

- Tampón Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8
- EDTA 2 mM
- 2-Mercaptoetanol 100 mM

4.14.2. PROCEDIMIENTO

Luego de la detección las membranas fueron lavadas con TBST tres veces durante 10 minutos e incubadas con 10 ml de tampón de despegado que contiene: Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, EDTA 2 mM, 2-Mercaptoetanol 100 mM, durante 30 minutos a 50 °C. A continuación las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con TBST e incubadas con solución de leche al 5 % en TBST durante 2 horas. La incubación con un nuevo anticuerpo primario se realiza como se indica en la sección 4.13.2

4.15. INMUNODETECCIÓN DE Cítocromo c

El citocromo c es utilizado como un indicador temprano de apoptosis. Cuando las células son expuestas a estímulos pro-apoptóticos el citocromo c es liberado de la mitocondria al citoplasma donde esta asociado con la activación de otras proteínas de apoptosis tales como caspasa 9 y caspasa 3.

4.15.1. MATERIALES

- Tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7.4, manitol 220 mM, sacarosa 68 mM, ClK 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM)
- Inhibidores de proteasas: 1 mM PEFABLOC®, 10 µg/ml pepstatina, 10 µg/ml leupeptina
- Homogeneizador de embolo.
- Anti-citocromo c monoclonal isotipo IgG_{2b} clon 7H8.2C12 (Pharmingen)
- Anti-citocromo c policlonal producido en conejo (sección 4.11)
- Anti-IgG ratón y anti-Ig G conejo conjugado con peroxidasa

4.15.2. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN CITOPASMÁTICA LIBRE DE MITOCONDRIAS.

La preparación de la fracción citoplasmática libre de mitocondrias se realizó siguiendo el método propuesto por (348). Se sembraron 3×10^6 células en placas de 5 ml y se dejaron crecer durante 18 horas antes de realizar los respectivos tratamientos, luego las células fueron recogidas por centrifugación a 300 g durante 3 minutos, suspendidas y lavadas en PBS frío dos veces seguidas. El precipitado de células fue suspendido en un tampón de lisis que contiene HEPES 50 mM pH 7.4, manitol 220 mM, sucrosa 68 mM, ClK 50 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, al que se añadieron los inhibidores de proteasas: 1 mM PEFABLOC®, 10 µg/ml pepstatina, 10 µg/ml leupeptina, después de 30 minutos de incubación en hielo, las células fueron rotas con un homogeneizador de teflón (40 golpes). Los homogeneizados celulares fueron centrifugados a 14.000 g durante 15 minutos y los sobrenadantes fueron recuperados, a los que se llamaron fracción citoplasmática libre de contenido mitocondrial.

4.15.3. CONDICIONES DE LA SDS-PAGE, LA TRANSFERENCIA Y LA INMUNODETECCIÓN

La separación de proteínas para la detección de citocromo c por SDS-PAGE fue realizada cargando 15 µg de proteínas en geles de 12.5 % y las condiciones de la electroforesis fue de 150 V constantes durante 75 minutos, las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF por el método de transferencia húmeda. A continuación las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBST enriquecida con leche desnatada al 5 % durante 12 horas, e incubadas durante 4 horas con anti-citocromo c monoclonal a una dilución de 1:2000 o 3 horas con anti-citocromo c policlonal a una dilución de 1:3000, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, e

incubaron con anticuerpo secundario con anti ratón o anti conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA) a una dilución de 1:20 000 durante una hora y se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS. La detección fue realizada por el método de ECL

4.16. INMUNODETECCIÓN DE Bcl-2

4.16.1. MATERIALES

- Tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM ClNa, 5 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100)
- Inhibidores de proteasas (1 mM PEFABLOC®, 10 µg/ml pepstatina A, 10 µg/ml leupeptina)
- Anti- Bcl-2 policlonal(ΔC 21) y anti-Bcl-2 policlonal (N 19) (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-Ig G de conejo conjugado con peroxidasa

4.16.2. OBTENCION DE HOMOGENEIZADO

Se sembraron 3 x 10⁶ células en placas de 5 ml y se dejaron crecer durante 18 horas (80 % de confluencia) antes de realizar los respectivos tratamientos, luego las células fueron recogidas por centrifugación a 300 g durante 3 minutos, suspendidas y lavadas en PBS frío dos veces seguidas por centrifugación. El precipitado de células fue suspendido en un tampón de lisis que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM ClNa, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, suplementado antes de su uso con 1 mM PEFABLOC®, 10 µg/ml pepstatina A, 10 µg/ml leupeptina, la lisis se realizó durante 30 minutos a 4 °C , los homogeneizados fueron centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue recuperado. (Nota: la separación de proteínas por SDS-PAGE para el Western Blot de Bcl-2, se realiza con homogeneizado fresco, máximo 6 horas después de su obtención).

4.16.3. CONDICIONES DE LA SDS-PAGE E INMUNODETECCIÓN

La separación de proteínas para la detección de Bcl-2 por SDS-PAGE fue realizada cargando 15 µg de proteínas en geles de 12.5 % . Las condiciones de la electroforesis fueron de 150 V constantes durante 75 minutos, las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF por el método de transferencia húmeda. A continuación las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBST enriquecida con leche desnatada al 5 % durante 12 horas, e incubadas durante 6 horas con anti-Bcl-

2 a una dilución de 1:2000, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, e incubaron con anticuerpo secundario con anti-conejo conjugado con peroxidasa (SIGMA) a una dilución de 1:20 000 durante una hora, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS. La detección fue realizada por el método de ECL.

4.17. INMUNODETECCIÓN DE FOSFO-TIROSINA Y c-*Src*

4.17.1. MATERIALES

- Tampón de lisis: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 2 % de nonidet NP-40, 25 mM MgCl₂, 1 mM de DTT
- Inhibidores de proteasas: PEFABLOC®, Aprotinina, Pepstatina, Leupeptina (Roche)
- Inhibidores de fosfatasa: Ortovanadato de sodio, Phenilarsine oxide (PAO) (SIGMA).
- Anti fosfotirosina - PY20 (Transductions Laboratories)
- Anti v-*Src* (Ab-1) monoclonal clone 327 (Calbiochem)
- Anti c*Src* monoclonal clone 28 (Dr. H. Kawakatsu, Lung Biology Center, University of California)

4.17.2. OBTENCION DE HOMOGENEIZADO

Se sembraron 3 x 10⁶ células en placas de 5 ml y se dejaron crecer durante 16 horas (80 % de confluencia) antes de realizar los respectivos tratamientos, después de los tratamientos las células fueron recogidas por centrifugación a 300 g durante 3 minutos, suspendidas y lavadas en PBS frío dos veces seguidas por centrifugación. El precipitado de células fue suspendido en un tampón de lisis que contiene: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 2 % de nonidet NP-40, 25 mM MgCl₂, 1 mM de DTT, suplementado antes de su uso con 1 mM de PEFABLOC®, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 mM de ortovanadato de sodio, 50 µM PAO. Los homogeneizados fueron centrifugados a 12.000 g durante 25 minutos y el sobrenadante fue usado para la detección con anti-fosfotirosina, anti c-*Src* clone 327, anti c-*Src* clone 28.

4.17.3. CONDICIONES DE LA SDS-PAGE Y LA INMUNODETECCIÓN DE FOSFOTIROSINA.

La separación de proteínas para la detección de fosfotirosina por SDS-PAGE fue realizada cargando 30 µg de proteínas en geles de 12.5 % y de 7.5 %, las condiciones de la electroforesis fueron de 150 V constantes durante 75 minutos. Las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF por el método de transferencia húmeda. A continuación las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBST enriquecida con leche desnatada al 5 % durante 12 horas, e incubadas durante 2 horas con anti-PY20 a una dilución de 1:2.000, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, e incubaron con anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:20.000 durante una hora, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS. La detección fue realizada por el método de ECL

4.17.4. CONDICIONES DE LA SDS-PAGE E INMUNODETECCIÓN DE c-Src

La separación de proteínas para la detección de c-Src por SDS-PAGE fue realizada cargando 30 µg de proteínas en geles de 10 % y las condiciones de la electroforesis fueron de 150 V constantes durante 75 minutos, las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF por el método de transferencia húmeda. A continuación las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBST enriquecida con leche desnatada al 5 % durante 12 horas, e incubadas durante 1 hora con anti-c-Src clone 327 y anti-c-Src clon 28, ambos a una dilución de 1:2000, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, e incubaron con anticuerpo secundario con anti ratón conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:20 000 durante una hora, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS. La detección fue realizada por el método de ECL

4.18. INMUNOPRECIPITACIÓN DE Bcl-2 Y c-Src.

4.18.1. MATERIALES

- Tampón de lisis para Bcl-2 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM ClNa, 5 mM MgCl₂, 1 % Triton x-100)
- Tampón de lisis para c-Src (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 2 % de nonidet NP-40, 25 mM MgCl₂)
- Inhibidores de proteasas (1 mM PEFABLOC®, 10 µg/ml pepstatina A, 10 µg/ml leupeptina)

- Inhibidores de fosfatasa (2 mM de ortovanadato de sodio, 50 μ M PAO)
- Sepharosa proteína G
- Tampón fosfato 20 mM pH 7.5
- Anti Bcl-2
- Anti-c-Src

4.18.2. INMUNOPRECIPITACIÓN DE Bcl-2

En placas de 15 x 100 mm fueron cultivadas 1×10^7 células durante 24 h en medio completo y recogidas con PBS frío por centrifugación a 300 g durante 3 minutos, luego fueron lavadas dos veces y suspendidas en un tampón de lisis que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM ClNa, 5 mM MgCl₂, 1 % Triton x-100, al que añadió antes de su uso 1 mM PEFABLOC®, 10 μ g/ml pepstatina A, 10 μ g/ml Leupeptina. La ruptura fue realizada durante 30 minutos a 4 °C. La fracción soluble fue separada por centrifugación a 15.000 g durante 15 minutos y utilizada como homogeneizado clarificado para la inmunoprecipitación de Bcl-2, para lo cual se adiciono 2 μ g de anti Bcl-2 por cada 1 mg de proteína del homogeneizado, esta mezcla fue incubada durante 12 horas en agitación a 4°C y el complejo anti-Bcl-2-Bcl-2 fue recuperado incubando la mezcla con 50 μ l de Sepharosa proteína G más un volumen de tampón de unión (Tampón fosfato de sodio 20 mM pH 7.5), durante 4 horas a 4 °C en agitación. El complejo unido a la Sepharosa se lava tres veces con tampón de unión y finalmente se suspende en tampón de quinasas. La proteína inmunoprecipitada fue guardada a -80 °C hasta el momento de su uso.

4.18.3. INMUNOPRECIPITACIÓN DE c-Src.

Las células (1×10^7) fueron cultivadas en placas de 15 x 100 mm durante 24 h en medio completo y recogidas con PBS frío por centrifugación a 300 g durante 3 minutos, luego fueron lavadas dos veces y suspendidas en un tampón de lisis que contiene: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 2 % de nonidet NP-40, 25 mM MgCl₂, 1 mM de DTT, al que se añadió antes de su uso 1 mM de PEFABLOC®, 10 μ g/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de pepstatina, 10 μ g/ml de leupeptina, 2 mM de ortovanadato de sodio, 50 μ M PAO. Las muestras fueron tratadas con ultrasonidos con tres pulsos de 10 segundos con intervalos de 3 minutos, la fracción soluble fue separada por centrifugación a 15.000 g durante 15 minutos y utilizada como homogeneizado clarificado para la inmunoprecipitación de c-Src, para lo cual, se añadió 1 μ g de anti c-

Src clon 327 por cada 1 mg de proteína del homogeneizado, esta mezcla se dejó incubando durante 12 horas en agitación a 4°C y el complejo anti-c-Src-c-Src fue recuperado incubando la mezcla con 50 µl de Sepharosa proteína G más un volumen de tampón de unión (Tampón fosfato de sodio pH 7.5), durante 4 horas a 4°C en agitación. El complejo unido a la Sepharosa fue lavado tres veces con tampón de unión y finalmente suspendido en tampón de quinasas, si no se realizaran los experimentos inmediatamente se guardan a -80 °C. La c-Src activa fue inmunoprecipitada con el anti-c-Src clon 28 (349) siguiendo el mismo procedimiento.

4.19. ESTUDIOS DE FOSFORILACIÓN DE Bcl-2

4.19.1. MATERIALES

- Bcl-2 inmunoprecipitada
- c-Src inmunoprecipitada
- ATP no marcado
- [γ -³²P]ATP
- Tampón de quinasas
- Tampón de Laemmli

4.19.2. PROCEDIMIENTO

Todos los experimentos de fosforilación fueron realizados utilizando 10 µl del Bcl-2 inmunoprecipitada a partir de células control como sustrato de fosforilación. A 30 µg de proteína de los homogeneizados problema se incubó a 30 °C durante 20 minutos en una mezcla de reacción que contiene 10 µl de Bcl-2 inmunoprecipitada, 20 µM de ATP, 1 µCi [γ -³²P]ATP, y completado a 30 µl de volumen final con tampón de quinasas. La reacción fue terminada con 6 µl de tampón de Laemmli 5X. Las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 5 minutos, centrifugadas a 15.000 g durante 15 minutos y separadas en SDS-PAGE al 12,5 %. Las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a una membrana de PVDF y la radiación incorporada fue detectada por autoradiografía.

Cuando se realizaron los experimentos de fosforilación de Bcl-2 por c-Src, la fuente de quinasas que se utilizó fue la c-Src inmunoprecipitada a partir de células tratadas según las condiciones indicadas.

4.20. ESTUDIOS *in vivo* E *in vitro* DE LA ACTIVIDAD DE c-Src TIROSINA QUINASA.

4.20.1. MATERIALES

- Ácido acético 50 mM
- Tampón HEPES 1 mM pH 7.4
- ATP no marcado
- [γ ³²P]ATP
- Enolasa
- Tampón de quinasas
- c-Src inmunoprecipitada

4.20.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE c-Src

La actividad de quinasa de la c-Src fue medida utilizando como sustrato la enolasa previamente desnaturizada según (350), para ello se preparó una solución de enolasa a una concentración de 1.5 mg/ml, la que fue incubada con un volumen de ácido acético 50 mM durante cinco minutos a 30 °C, luego la mezcla fue neutralizada añadiendo medio volumen de HEPES 1mM pH 7.4.

Para la medición de la actividad de quinasa, 15 μ l de la c-Src inmunoprecipitada fue incubada en una mezcla de reacción que contiene 10 μ g de enolasa desnaturizada, 20 μ M de ATP no marcado, 1 μ Ci [γ ³²P]ATP y completado a un volumen final de 30 μ l con tampón de quinasas, a 30 °C durante 20 minutos. La reacción fue detenida agregando 6 μ l de tampón de Laemmli 5X, a continuación fue calentada a 100 °C durante 5 minutos, centrifugada a 15.000 g durante 15 minutos y separada en una SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF y la emisión de la radiación fue detectada por autoradiografía.

NOTA: Las membranas de PVDF después de la autoradiografía se utilizaron para detectar por inmunodetección la fosforilación en tirosina con anti PY20 y la cantidad de c-Src con anti-c-Src clone 327.

4.20.3. OBTENCIÓN c-Src INACTIVA

Para obtener c-Src inactiva se cultivaron 1×10^7 células durante 6 horas en ausencia de suero, luego fueron recogidas y lavadas dos veces en PBS frío y suspendidas en tampón de lisis* que contiene 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de EGTA, 40 mM de glicerofosfato, 2 % de nonidet NP-40, 25 mM MgCl₂, suplementado antes de su uso con 1 mM de

PEFABLOC®, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 mM de ortovanadato de sodio, 50 µM PAO e incubadas durante 1 hora a 4 °C. La inmunoprecipitación de c-Src fue realizada siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.18.2.

* Es importante observar que este tampón no lleva DTT, debido a que la proteína purificada a partir de este homogeneizado servirá para realizar estudios de activación in vitro por NO y el DTT podría interferir en la interacción entre los grupos tioles de la proteína y el NO

4.20.4. ACTIVACIÓN IN VITRO DE c-Src POR EL ÓXIDO NÍTRICO

Para la activación in vitro de la quinasa, 10 µl del inmunoprecipitado de la c-Src inactiva fue pre-incubada durante 10 minutos a 30 °C con ATP no marcado 20 µM, a continuación se añadió DETA/NO 10 µM, 1 µCi [γ -³²P]ATP y se completó a 30 µl con tampón de quinasas sin DTT, e incubó a 30 °C durante 20 minutos. La reacción fue terminada agregando 6 µl de tampón de Laemmli 5X, luego fue calentada a 100 °C durante cinco minutos y separado por SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y la emisión de la radiación fue detectada por autoradiografía. En estas mismas membranas se realiza la inmunodetección de fosfotirosina con anti PY20 y de c-Src total con anti c-Src clone 327.

5. RESULTADOS

El papel del óxido nítrico sobre la apoptosis es polémico, ya que en muchos modelos celulares elevadas concentraciones de óxido nítrico exógeno o endógeno generado debido a la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2) producen apoptosis (248 - 266), pero en otros modelos tiene un efecto antiapoptótico (289 - 303), es más en todos los estudios en que se utilizaron bajas concentraciones de óxido nítrico, éste promueve un efecto antiapoptótico (296, 299, 306). Los mecanismos moleculares mediante los cuales el NO induce ambos tipos de respuesta aun no están aclarados. Nosotros estudiamos ambos aspectos del papel del NO poniendo énfasis en la participación de la Proteína Quinasa dependiente de GMPc (PKG) en la regulación de estas respuestas utilizando como modelo celular las células RINm5F. Los resultados obtenidos son presentados en dos secciones: en la primera sección mostramos el efecto de altas concentraciones de NO, que en tales condiciones es un inductor de apoptosis y en la segunda sección presentamos los resultados obtenidos utilizando bajas concentraciones de NO en condiciones de apoptosis inducida por la ausencia de suero en las que el NO se comporta como antiapoptótico

5.1.EL ÓXIDO NÍTRICO INDUCE APOPTOSIS EN CÉLULAS RINm5F

En esta sección estudiaremos el papel proapoptótico del NO, a lo largo de ella presentaremos los resultados obtenidos utilizando altas concentraciones de NO. En el primer apartado de esta sección caracterizamos el efecto apoptótico del NO expresado en índices de apoptosis tales como: a) detección de fragmentos de ADN por los métodos de electroforesis en geles de agarosa, y de la detección inmunológica de fragmentos de ADN asociados a histonas (nucleosomas o oligonucleosomas) por la técnica de ELISA, b) la activación de caspasas, c) la degradación de la proteína Bcl-2, y d) la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma; en el segundo apartado estudiaremos el efecto del NO sobre la mitocondria poniendo especial énfasis en la participación del poro responsable de su permeabilidad transitoria (PT) en la liberación de citocromo c; y en el tercer apartado estudiaremos la relación existente entre la respuesta apoptótica inducida por el NO y la vía de señalización sGC→GMPc→PKG.

5.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL ÓXIDO NÍTRICO

En este primer apartado presentaremos los resultados obtenidos en la caracterización de nuestro sistema de trabajo y consta de lo siguiente: resultados de la fragmentación de

ADN detectados por las técnicas de electroforesis en geles de agarosa y de ELISA, de la activación de caspasas, de la degradación de Bcl-2 y de la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma.

5.1.1.1.FRAGMENTACIÓN DE ADN

La interleuquina-1 β y los dadores de óxido nítrico inducen la aparición de indicadores apoptóticos. La Figura 1 A muestra que tanto el óxido nítrico generado por la activación de la NOS2 inducida por la IL-1 β , así como el óxido nítrico liberado por el nitroprusiato de sodio (SNP) en solución acuosa, inducen la aparición de fragmentos de ADN en forma de escalera típicas de la muerte celular por apoptosis.

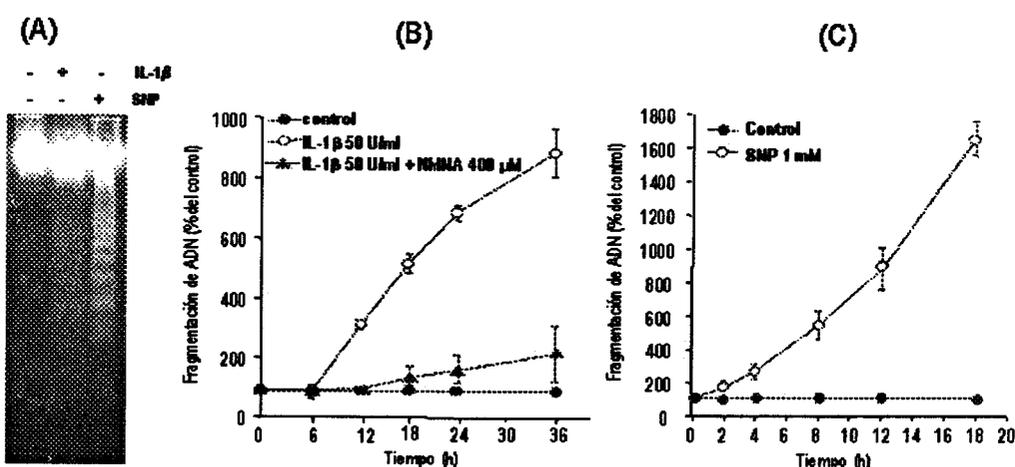


Figura 1. Efecto de la Interleuquina 1 β (IL-1 β) y el Nitroprusiato de Sodio (SNP) sobre la fragmentación de ADN. A. Los fragmentos de ADN inducidos por el NO pueden ser detectados por la técnica de electroforesis en geles de Agarosa. Las células fueron cultivadas durante 24 horas con IL-1 β (50 U/ml) y 12 horas conl SNP (1 mM). La técnica de detección de oligonucleosomas por electroforesis en geles de agarosa fue realizada conforme al procedimiento detallado en Materiales y Métodos. B y C. Cinética de fragmentación de ADN inducido por NO endógeno y exógeno. Las células fueron cultivadas durante 0, 6, 12, 18, 24 y 36 horas con IL-1 β 50 U/ml en presencia o ausencia de NMMA 400 μ M y 0, 2, 6, 12 y 18 h con SNP 1 mM. La determinación de la fragmentación de ADN por el método de ELISA fue realizada conforme al procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Para A la Figura es representativa de tres experimentos independientes, para B y C los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes

La detección de la señal por esta técnica sólo es posible cuando el grado de apoptosis es avanzado, en estadios iniciales como a las 10 horas con IL-1 β o a las 2 horas con SNP no nos fue posible detectar señal alguna, por esta razón probamos otras técnicas de detección de fragmentos de ADN que tengan mayor sensibilidad a etapas tempranas de la apoptosis, la técnica que con la que se obtuvieron mejores resultados fue la detección inmunológica de nucleosomas por ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1B y 1C. La fragmentación de ADN inducida por la IL-1 β fue seguida a lo largo de 36 horas y la inducida por el SNP fue de 12 horas. Como se observa los fragmentos de ADN fueron detectados a partir de las

dos horas para el caso del SNP y a partir de las 10 horas para el caso de la IL-1 β . El hecho que la fragmentación de ADN inducida por la IL-1 β sea prácticamente inhibida por el NMMA un inhibidor de las NOS confirma que la apoptosis inducida por esta citoquina es debida al NO.

5.1.1.2. ACTIVACIÓN DE CASPASAS

El hecho de que los inhibidores de caspasas, el Z-VAD-FMK un inhibidor general de caspasas y el Z-YVAD-FMK un inhibidor de caspasa 1, disminuyen la fragmentación de ADN inducida por el SNP indican que la activación de caspasas es un paso importante en la apoptosis inducida por el NO (Figura 2 A). Sin embargo, no detectamos actividad alguna cuando se realizó la medición directa de la actividad de la caspasa 3 y de la caspasa 1 en los homogeneizados, cosa que era incomprensible ya que los resultados de fragmentación de ADN indicaban que se produce activación de caspasas.

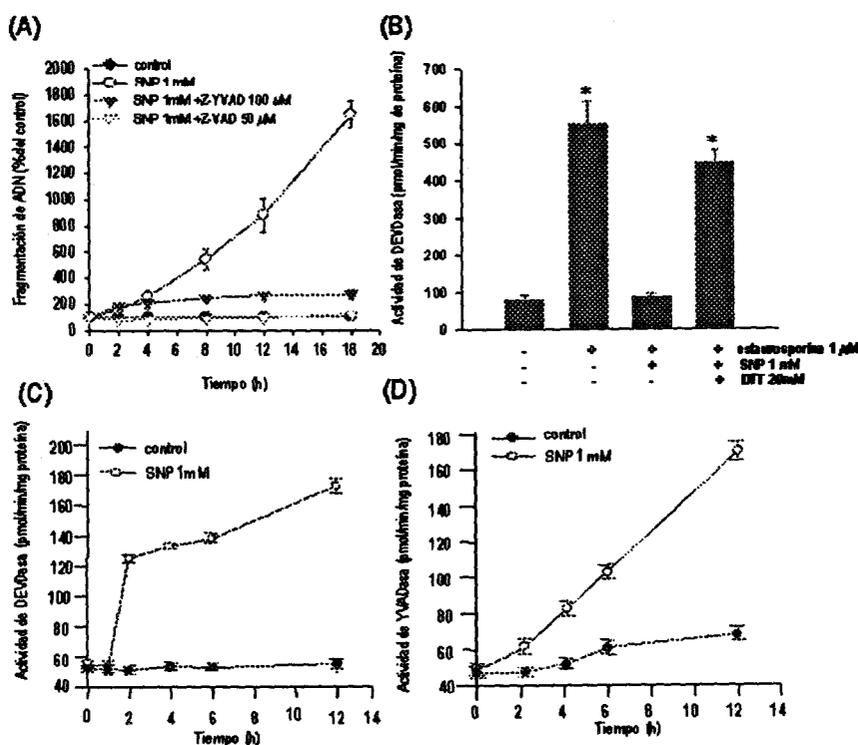


Figura 2. En la apoptosis inducida por el NO se produce la activación de caspasas. A. La fragmentación de ADN inducida por el NO es inhibida por el Z-VAD.FMK y el Z-YVAD.FMK. Las células fueron cultivadas durante los tiempos indicados en medio de cultivo conteniendo SNP 1 mM, Z-VAD.FMK 50 μ M y Z-YVAD.FMK 100 μ M. La fragmentación de ADN fue determinada según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. B. El estado redox del medio de reacción determina la actividad de caspasa 3. Homogeneizados provenientes de células tratadas con estaurosporina 1 μ M durante siete horas fueron incubados in vitro con SNP 1 mM durante 30 minutos y posteriormente con DTT 20 mM durante 20 minutos, los homogeneizados controles y tratados fueron pasados por una columna de Sephadex G-25 y luego la actividad de caspasas fue medida según como se indica en Material y Métodos. C y D. El NO induce la activación de caspasa 3 y caspasa 1. La actividad de caspasas fue medida en homogeneizados provenientes de células que fueron tratadas con SNP 1 mM durante los tiempos indicados tal como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm la desviación

estándar de cinco experimentos independientes. Para la comparación de grupos se usó ANOVA de una vía, * estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el proceso de estandarización de la técnica observamos que cuando los homogeneizados que tenían alta actividad de caspasas provenientes de células tratadas con estaurosporina eran incubados *in vitro* con SNP 1 mM la actividad de caspasa 3 está inhibida completamente (Figura 2B), lo que indica que el NO puede inhibir directamente a la caspasa 3. Al mismo tiempo fueron apareciendo referencias bibliográficas de que el NO puede inactivar a las caspasas por S-nitrosilación del residuo de cisteína de su sitio activo (84, 85, 294, 297, 304, 305), lo que viene a explicar la razón por la que no podíamos medir directamente la actividad de caspasas en los homogeneizados, nosotros encontramos que este fenómeno es reversible dependiendo del estado redox del medio de reacción. Cuando al medio de reacción se adicionan altas concentraciones de DTT se recupera la actividad, previa eliminación del exceso de sustancias óxido-reductoras a través de una columna de sephadex G-25 (Figura 2B). Con estos ajustes a la técnica de medición de caspasas a continuación se procedió a medir la cinética de activación de la caspasa 3 y de la caspasa 1 inducidas por el SNP (Figura 2C y 2D), los resultados encontrados indican que la caspasa 3 es activada rápidamente entre la primera y segunda hora de incubación, en cambio la caspasa 1 es activada lenta pero continuamente desde el inicio de la incubación.

5.1.1.3. SALIDA DE CITOCROMO C.

Tanto el NO endógeno generado por la activación de la NOS2 por la IL-1 β , como el NO exógeno liberado a partir de dadores como el SNAP, SIN-1 y el SNP inducen la liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma (Figuras 3A y 3B), La comprobación de que el efecto de la IL-1 β es mediada por el NO se realizó inhibiendo la actividad de la NOS2 con el NMMA, en tales condiciones se observa que el NMMA cancela el efecto de la IL-1 β (Figura 1A). La liberación de citocromo c inducida por el SNP puede detectarse a partir de la primera hora de tratamiento, la señal es mayor a las 12 horas y es parcialmente degradada a las 24 horas (Figura 3B). En la siguiente sección abordaremos con mayor detalle el papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por el NO.

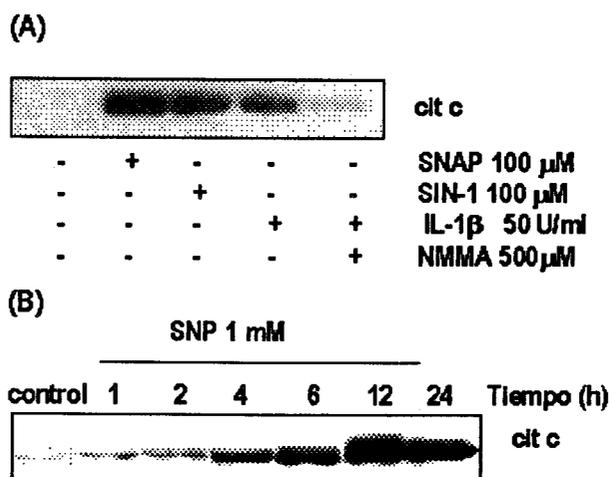


Figura 3. El NO induce la liberación de citocromo c de la mitocondria. A. Liberación de citocromo c inducido por NO exógeno y NO generado por la IL-1 β . Las células fueron expuestas a SNAP y SIN-1 durante 15 horas y a la IL-1 β y IL-1 β + NMMA por 24 horas. B. Cinética de liberación de citocromo c inducida por el SNP. Los extractos citosólicos fueron preparados a partir de células expuestas a SNP durante los tiempos indicados. Las inmunodetecciones de citocromo c fueron realizadas según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes

5.1.1.4. DEGRADACIÓN DE Bcl-2

Otro índice de muerte celular por apoptosis es la degradación de la proteína Bcl-2, en la Figura 4 A, se observa que tanto el NO exógeno liberado por el SNP y el NO endógeno producido la NOS2 al ser inducida por la IL-1 β provocan la degradación de la proteína Bcl-2. La degradación inducida por la IL-1 β es completamente restablecida por acción del NMMA lo que indica que es una consecuencia de la acción del óxido nítrico. La Figura 4B muestra que la degradación de Bcl-2 inducida por el SNP es dependiente del tiempo, se observa que la degradación de Bcl-2 puede ser detectada a partir de las 6 horas de exposición al SNP.

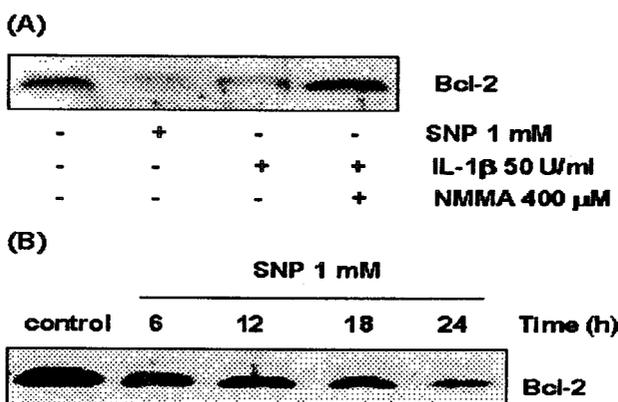


Figura 4. El NO produce la degradación de Bcl-2. A. Degradación de Bcl-2 inducida por el NO exógeno y NO generado por la IL-1 β . Las células fueron expuestas a SNP durante 12 horas y a la IL-1 β y IL-1 β + NMMA por 24 horas. B. Cinética de degradación de Bcl-2 inducida por el SNP. Los extractos citosólicos fueron preparados a partir de células expuestas a SNP durante los tiempos indicados La inmunodetección de Bcl-2 fue realizada según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes

5.1.2. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL NO.

Los mecanismos por los cuales el NO induce la salida de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma aún no están dilucidados, en este apartado presentamos evidencias de que tanto la disminución de la actividad energética de la mitocondria como mecanismos dependientes de la apertura del poro responsable de la permeabilidad transitoria mitocondrial (PT) participan en ésta acción. En primer lugar estudiaremos el efecto del NO sobre la actividad metabólica mitocondrial, luego su efecto sobre el hinchamiento mitocondrial por medio de la apertura del PT, a continuación estudiaremos el efecto del atractilósido sobre la salida de citocromo c y finalmente el efecto de inhibidores de PT sobre la salida de citocromo c.

5.1.2.1.EL EFECTO DEL NO SOBRE LA ACTIVIDAD METABÓLICA MITOCONDRIAL

El uso de altas concentraciones de NO podría estar afectando la actividad de la mitocondria, posiblemente debido a la acción que pueda ejercer sobre la cadena respiratoria y la actividad de enzimas de la mitocondria, un modo de medir esto es utilizando la capacidad de la succinato-tetrazolio reductasa, una enzima de la cadena respiratoria, de romper las sales de tetrazolio y convertirlas en formazán la que puede ser detectada por colorimetría. La figura 5 muestra los resultados de actividad metabólica mitocondrial obtenidos cuando las células son tratadas con diferentes donadores de NO, se observa que el SNP a concentraciones de 1 mM ejerce un fuerte efecto en la disminución de la actividad metabólica, nosotros exploramos la posibilidad que el efecto no sea exclusivamente causado por el NO, sino por el cianuro de potasio, que es el ligando del NO, y los resultados encontrados efectivamente confirman que hay un efecto conjunto de tanto del NO como del cianuro de potasio, ya que este produce una rápida disminución de la actividad metabólica pero en menor magnitud que el NO. Respecto a los demás donadores de NO, es el DETA/NO el que produce una rápida y mayor disminución de la actividad metabólica mitocondrial, mientras que los demás donadores producen una disminución lenta y de menor intensidad. Estos resultados indican que el NO afecta la actividad mitocondrial.

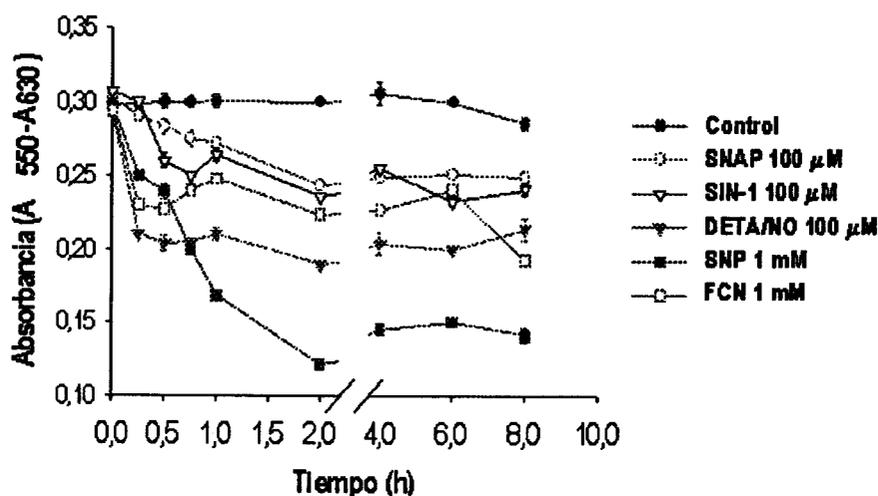


Figura 5. Efecto del NO sobre la actividad metabólica mitocondrial. Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de los dadores de NO a las concentraciones y tiempo indicados. La actividad metabólica fue medida de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los valores son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes

5.1.2.2. EL EFECTO DEL NO SOBRE LA APERTURA DEL PORO MITOCONDRIAL RESPONSABLE DE SU PERMEABILIDAD TRANSITORIA (PT)

En la figura 3 se mostró que el NO induce la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma, sin embargo aún no se conocen qué mecanismos lo regulan. Nosotros exploramos la posibilidad que el NO pueda inducir la salida de citocromo c a través de la apertura del PT, para ello en primer lugar realizamos experimentos in vitro de hinchamiento de las mitocondrias como medida de activación del PT en mitocondrias aisladas a partir de corazón de rata. La figura 6 muestra el efecto del SNP sobre el hinchamiento de la mitocondria, se observa que el SNP a los 10 minutos inicia una inducción de actividad de PT que es máxima a los 30 minutos y luego se mantiene constante, esta activación es cancelada completamente por efecto de la ciclosporina A (CsA), un inhibidor de la actividad del PT, el mecanismo de acción de la CsA ha sido ampliamente revisado en (194, 353), este mecanismo se puede resumir en que la CsA previene la asociación de la ciclofilina D y M (CyP-D, CyP-M) con la proteína transportadora de nucleótidos de adenina (ANT) interacción que es necesaria para la activación del PT, la unión de la CsA es en el sitio activo de las CyP, el que es crucial para que estas se unan a la ANT.

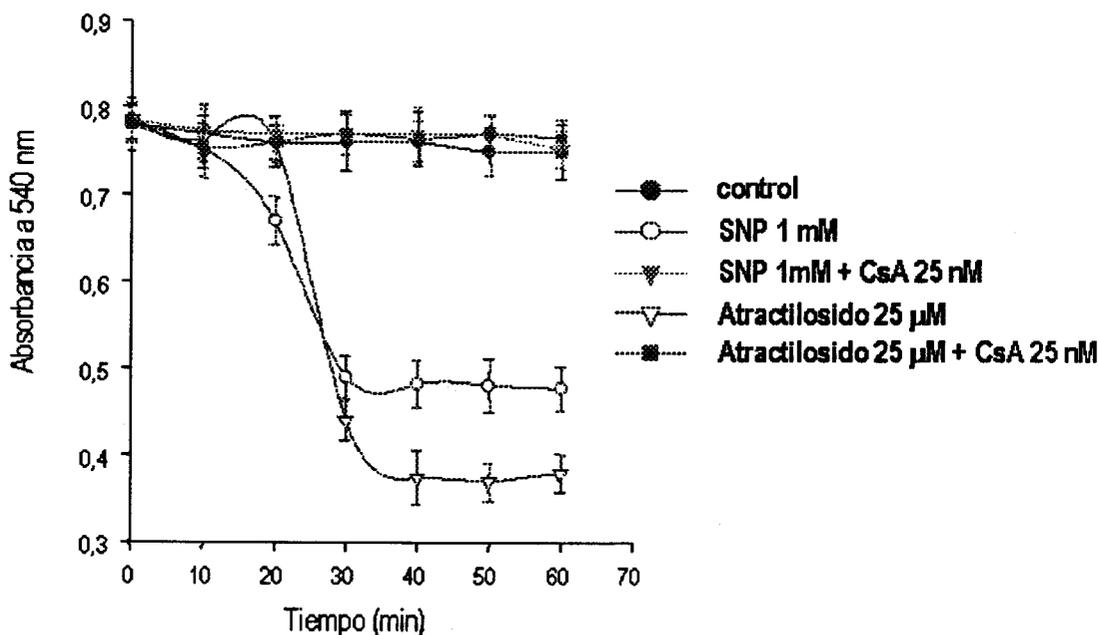


Figura 6. Efecto del SNP y del Atractilósido sobre el hinchamiento de la mitocondria. Las mitocondrias aisladas a partir de corazón de rata fueron incubadas con SNP 1 mM y Atractilósido 25 µM, en presencia o ausencia de ciclosporina A (CsA) 25 nM. La medición del hinchamiento de las mitocondrias fue realizado según el procedimiento que se detalla en Materiales y Métodos. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por otro lado estudiamos el efecto de un conocido activador de PT, el atractilósido, compuesto del que se conoce ampliamente su mecanismo de acción como inductor del PT (194), cuando las mitocondrias son incubadas con 25 µM de atractilósido se produce el hinchamiento a los 20 minutos y luego se mantiene constante, esta acción también es inhibida por la CsA. En resumen en este grupo de experimentos de hinchamiento de la mitocondria demuestran que el SNP induce la apertura del PT de manera similar al atractilósido, y que ambos fenómenos son inhibidos por la CsA, lo que lleva a pensar que ambos compuestos tienen un mecanismo de acción similar, siendo así, el atractilósido al igual que el NO debe inducir la liberación de citocromo c, la que debe ser inhibida por el efecto de la CsA.

La Figura 7 se muestran los resultados de experimentos realizados in vitro con mitocondrias aisladas a partir de corazón de rata y de experimentos realizados in vivo en cultivo de células, expuestas al atractilósido, a la IL-1 β y al SNP en presencia y ausencia de CsA, en el panel A se observa que el atractilósido y el SNP provocan la liberación de citocromo c en mitocondrias aisladas y que dicha acción es prevenida por la CsA. En el panel B se muestra la cinética de liberación de citocromo c en cultivo de células que fueron expuestas al atractilósido, se puede resaltar el hecho de que el atractilósido induce la liberación de citocromo a partir de

la primera hora de exposición y que es similar a la acción inducida por el SNP. Los paneles C, D y E muestran que en cultivo de células la liberación de citocromo c inducida por el atractilósido, el SNP y la IL-1 β son inhibidas significativamente por la CsA. En vista que el mecanismo de acción de la CsA es a través de la inhibición del PT, se puede concluir que en la liberación de citocromo c de la mitocondria es un mecanismo dependiente de la apertura del PT.

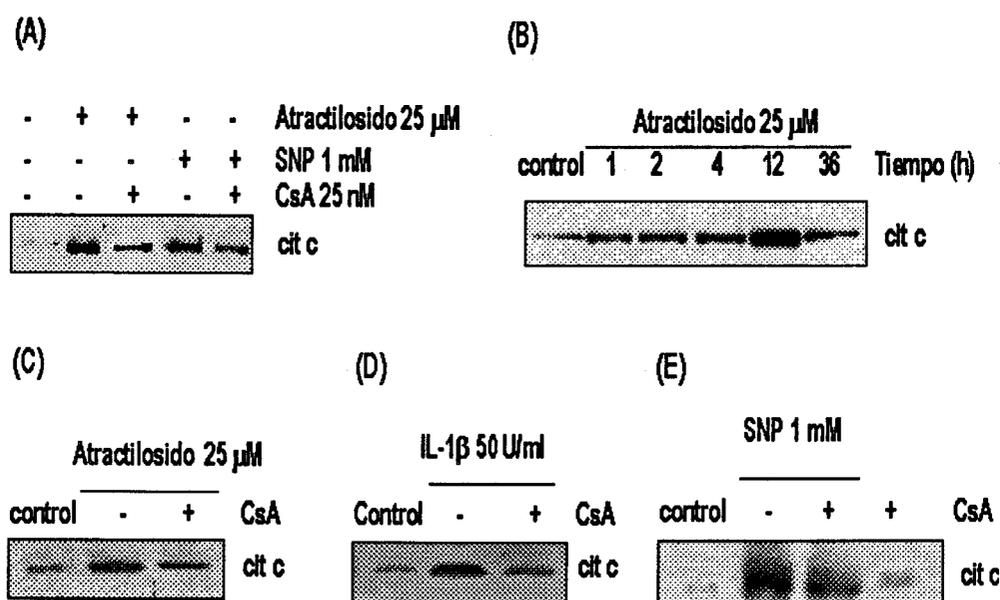


Figura 7. Efecto de la ciclosporina A sobre la liberación de citocromo c. A. La CsA disminuye la liberación de citocromo c inducida por el atractilósido y el SNP en mitocondrias aisladas de corazón de rata. Las mitocondrias (50 μ g de proteína total) fueron incubadas durante una hora en presencia o ausencia de atractilósido 25 μ M, SNP 1 mM y CsA 25 nM, la inmunodetección de citocromo c fue realizada en la fracción sobrenadante obtenida por centrifugación a 15.000 g según el protocolo que se describe en Materiales y Métodos. B. Cinética de liberación de citocromo c inducida por el atractilósido en cultivo de células RINm5F. Las células fueron cultivadas en presencia de atractilósido 25 μ M durante los tiempos indicados. C.D.E. La CsA disminuye la liberación de citocromo c inducida por el atractilósido, la IL-1 β y el SNP en cultivo de células RINm5F. Las células fueron cultivadas durante 12 horas en presencia o ausencia de atractilósido 25 μ M, SNP 1 mM y CsA 25 nM y de 24 horas en presencia de la IL-1 β . La inmunodetección fue realizada según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes.

5.1.2.3. EL CITOCROMO C PARTICIPA EN LA CASCADA APOPTÓTICA INDUCIDA POR EL NO

En los apartados anteriores se ha mostrado que tanto el NO como el atractilósido promueven la liberación de citocromo c de la mitocondria y que este fenómeno es dependiente de la apertura del PT, en consecuencia este es uno de los mecanismos por los que el NO induce la apoptosis, sin embargo queda aun por demostrar que en nuestro modelo de estudio la liberación de citocromo c inicia una cascada apoptótica

como la que fue descrita por (45), para demostrar esto en primer lugar nosotros estudiamos el efecto de la inhibición de la liberación de citocromo c por la CsA sobre la actividad de caspasa 3, nuestros resultados muestran que así como la CsA inhibe la salida de citocromo c, también inhibe significativamente la activación de caspasa 3 (Figura 8A) inducida por el SNP. Luego en experimentos *in vitro* encontramos que el citocromo c en presencia de dATP puede incrementar la actividad de caspasa 3 en homogeneizados provenientes de células control y no tiene un efecto significativo en homogeneizados provenientes de células tratadas con SNP (Figura 8B).

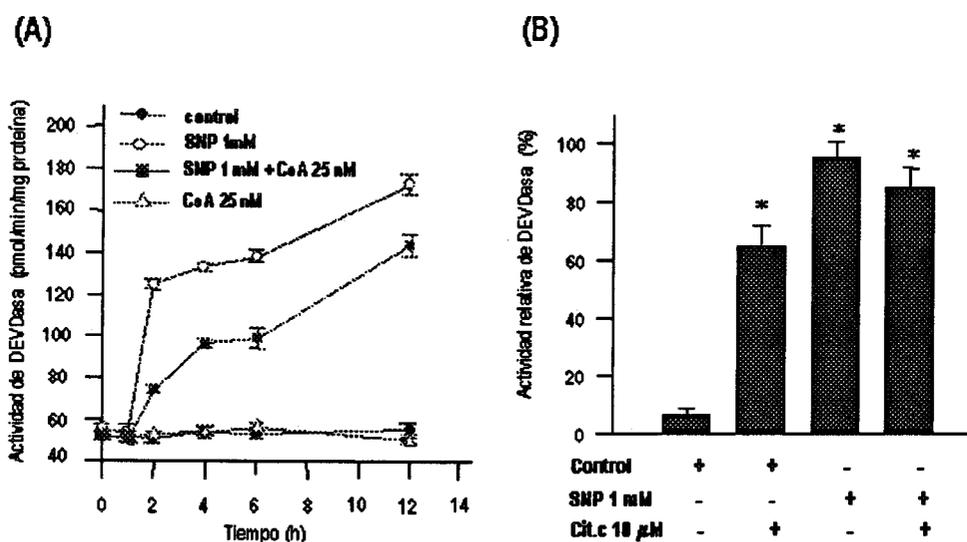


Figura 8. La liberación de citocromo c participa en la apoptosis inducida por el NO. A. La CsA disminuye la activación de caspasa 3 inducida por el NO. La actividad de caspasas fue medida en homogeneizados provenientes de células que fueron tratadas con SNP 1 mM en presencia o ausencia de CsA 25 nM durante los tiempos indicados tal como se indica en Materiales y Métodos. B. El citocromo c produce la activación de caspasa 3 *in vitro*. Homogeneizados provenientes de células control y células tratadas durante 12 h con SNP 1 mM fueron incubados durante 30 minutos con citocromo c 10 μM, dATP 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM. La actividad de caspasas fue medida según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ± la desviación estándar de cinco experimentos independientes. Para la comparación de grupos se uso ANOVA de una vía, * estadísticamente significativo $p \leq 0.05$ con respecto al control.

El efecto del Z-VAD.FMK, un inhibidor general de caspasas, sobre la liberación de citocromo c se muestra en la Figura 9A, en ella se observa que el Z-VAD.FMK inhibe parcialmente la liberación de citocromo c inducida por la IL-1 β y el SNP, estos resultados indican que la liberación de citocromo c es iniciado por el efecto del NO sobre la apertura del PT y que luego se establece un efecto de retroalimentación con la activación de caspasas. También observamos el efecto del Z-VAD.FMK sobre la degradación de Bcl-2 inducida por el SNP (Figura 9B), los resultados muestran que la degradación de Bcl-2 inducida por el NO es secundaria al efecto del NO sobre el PT y a la activación de caspasas.

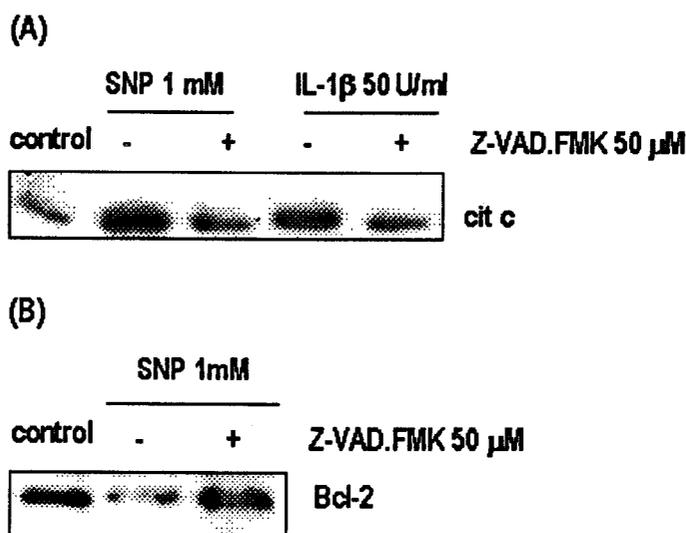


Figura 9. Efecto de la inhibición de caspasas sobre la liberación de citocromo c y la degradación de bcl-2. A. La inhibición de caspasas inhibe parcialmente la liberación de citocromo c inducida por el NO. Las células fueron tratadas con SNP 1 mM durante 12 horas y con IL-1 β durante 24 horas en presencia o ausencia de Z-VAD.FMK 50 μ M. La inmunodetección de citocromo c fue realizada según el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. B. La inhibición de caspasas cancela completamente la degradación de Bcl-2. Bcl-2 fue inmunodetectada a partir de homogeneizados provenientes de células tratadas con SNP 1mM durante 12 horas en presencia o ausencia de Z-VAD.FMK 50 μ M de acuerdo al protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes.

5.1.3. EL ÓXIDO NÍTRICO INDUCE LA ACTIVIDAD DE LA GUANILATO CICLASA Y DE LA PROTEÍNA QUINASA GMP c DEPENDIENTE

La señalización inducida por el NO está clásicamente relacionada con la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC), la producción de GMP c y la consiguiente activación de la proteína quinasa dependiente GMP c (PKG), recientemente se ha propuesto que la apoptosis inducida en células beta productoras de insulina HIT-T15 esta mediada por el sistema sGC/PKG (253), nosotros estudiamos en células RINm5F si la apoptosis inducida por el NO está mediada por la vía del GMP c . En el primer apartado de esta sección mostramos que las células RINm5F presentan actividad de sGC y de PKG, y su regulación por altas concentraciones de NO y en el segundo apartado la regulación de la apoptosis inducida por el NO por la vía de la sGC/PKG.

5.1.3.1. LAS CÉLULAS RINm5F PRESENTAN ACTIVIDAD DE GUANILATO CICLASA SOLUBLE (sGC) Y DE PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE GMP c (PKG), REGULABLES POR EL NO.

En primer lugar estudiamos si las células RINm5F presentan actividad de sGC y de PKG. En la Figura 10 A se muestran que éstas células presentan una actividad de sGC basal, la que es estimulada por el SNP, la magnitud de la estimulación es dependiente de la duración de los periodos de exposición, en periodos de exposición cortos (0-5-1.0 h) el SNP incrementa rápidamente la actividad enzimática NO-

activada, a largos tiempos de exposición (2.0-4.0 h) se inicia una sustancial reducción de la actividad enzimática NO-activada, llegando a ser estadísticamente comparables con la actividad enzimática basal a las 4.0 h de exposición. La actividad enzimática basal de la sGC no fue significativamente afectada por la exposición al SNP.

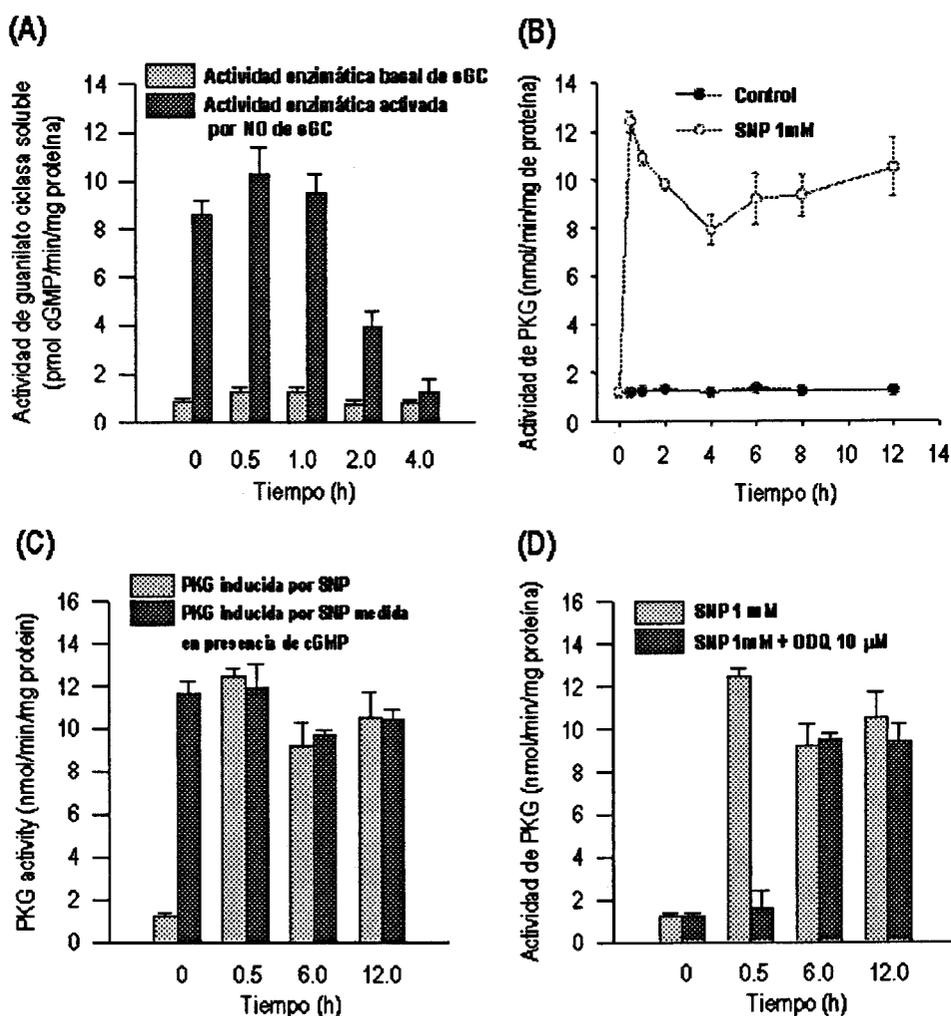


Figura 10. Efecto de la exposición del SNP sobre la actividad de la Guanilato Ciclasa soluble (sGC) y Proteína Quinasa dependiente de GMPc (PKG) en células RINm5F. A. Actividad de sGC. Homogeneizados provenientes de células control y de células expuestas a SNP 1 mM durante 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 horas fueron utilizados para determinar la actividad enzimática basal y NO-activada de sGC de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. B. Cinética de Activación de PKG inducida por el NO. La actividad de PKG fue medida en homogeneizados de células expuestas a SNP 1 mM durante los tiempos indicados siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. C. Efecto del GMPc sobre la actividad de la PKG inducida por el SNP 1 mM. En homogeneizados provenientes de células control y células expuestas a SNP 1 mM durante 12 horas fue medida la actividad de PKG en presencia o ausencia de GMPc 10 µM según el protocolo que se describe en Materiales y Métodos. D. Efecto del ODQ sobre la actividad de la PKG. La actividad de PKG fue medida en homogeneizados provenientes de células que fueron expuestas a SNP 1 mM en presencia o ausencia de ODQ 10 µM según el protocolo que se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. *

En la Figura 10 B se muestra que las células RINm5F presentan actividad de la PKG la que es rápidamente incrementada hasta en 10 veces cuando las células son

expuestas al SNP, es importante hacer notar que a las 4 horas de exposición hay una disminución significativa de la actividad de la PKG que se restablece a las 6 horas y es máxima a las 12 h de exposición. En la Figura 10 C se observa que la adición de GMPc al sistema de ensayo incrementa en 10 veces la actividad de la PKG de los homogeneizados provenientes de células control, pero no tiene ningún efecto sobre la actividad de la PKG en los homogeneizados provenientes de células tratadas con SNP. La Figura 10 D muestra que el ODQ un inhibidor específico de la sGC bloquea completamente la activación de la PKG inducida por periodos cortos de exposición al SNP (0.5 h), pero no inhibe cuando los periodos de incubación son largos (6.0 - 12.0 h)

5.1.3.2. REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL NO EN LAS CÉLULAS RINm5F

En este apartado estudiamos la regulación del sistema sGC/PKG sobre la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma, la activación de caspasas, el efecto del NO sobre el ADN y la necrosis celular, y la degradación de Bcl-2.

5.1.3.2.1. REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOCROMO C INDUCIDA POR EL NO EN LAS CÉLULAS RINm5F

En la Figura 11 A se muestra que tanto el ODQ un inhibidor de la sGC y el KT-5823 un inhibidor de la PKG no son capaces de contrarrestar las acciones inducidas por el NO generado químicamente sobre la liberación de citocromo c de la mitocondria. Por otro lado la exposición de las células al análogo dibutilil del GMPc (dbGMPc) induce la liberación de citocromo c de la mitocondria al citoplasma acción que es completamente prevenida por el KT-5823. Similares resultados fueron obtenidos cuando el NO fue generado endógenamente luego de la exposición de las células a la IL-1 β (Figura 11 B)

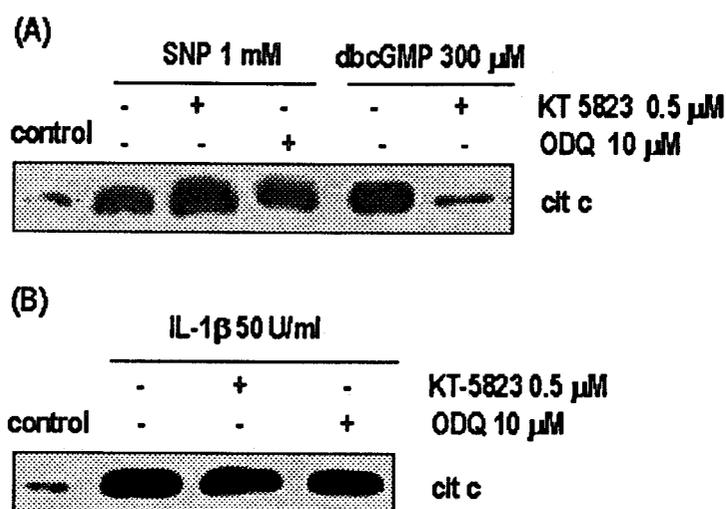


Figura 11. Papel del GMPc sobre la liberación de citocromo c inducida por el NO. A. Liberación de citocromo c inducida por el SNP y el dbGMPc. La liberación de citocromo c fue detectada en homogeneizados provenientes de células que fueron expuestas a SNP 1 mM y dbGMPc 300 μ M durante 12 h en presencia o ausencia de ODQ 10 μ M y de KT-5823 0.5 μ M, los que fueron adicionados 30 minutos antes de la adición de SNP y dbGMPc según el procedimiento que se detalla en Materiales y Métodos. B. Liberación de citocromo c inducida por la IL-1 β . La liberación de citocromo c fue detectada en homogeneizados provenientes de células que fueron expuestas a IL-1 β 50 U/ml durante 24 horas en presencia o ausencia de ODQ 10 μ M y de KT-5823 0.5 μ M que fueron adicionados 30 minutos antes que la IL-1 β según el procedimiento que se detalla en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de al menos tres experimentos independientes

5.1.3.2.2. REGULACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN Y LA NECROSIS CELULAR INDUCIDA POR EL NO EN LAS CÉLULAS RINm5F.

La figura 12 A muestra que tanto la fragmentación inducida por el SNP y la IL- β no fueron inhibidas ni por el ODQ ni por el KT-5823, por el contrario la fragmentación inducida por el GMPc fue completamente prevenida por el KT-5823. El SNP, la IL-1 β y el dbGMPc estimulan la liberación de LDH al medio, la que es completamente prevenida por la inhibición de la vía sGC/PKG con el ODQ y el KT-5823 (Figura 12 B).

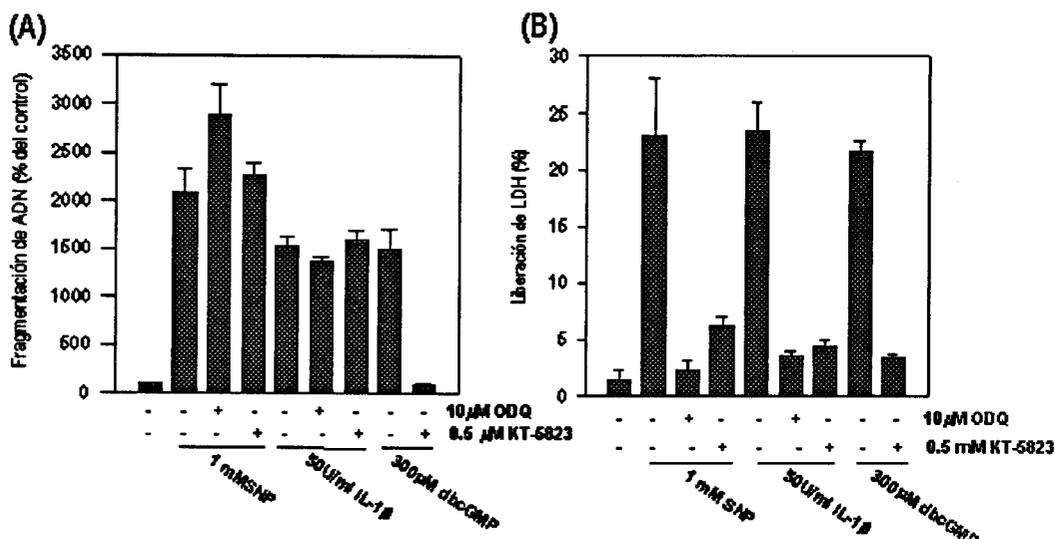


Figura 12. La fragmentación de ADN es independiente del sistema sCG/PKG. Las células fueron expuestas durante 12 horas al SNP 1 mM, dbGMPc 300 mM y durante 24 h a la IL-1β 500U/ml, en presencia o ausencia de los inhibidores ODQ 10 μM y KT-5823 0.5 μM, los cuales fueron adicionados media hora antes que el SNP, dbGMPc y la IL-1β. A. Fragmentación de ADN en nucleosomas. B. Porcentaje de liberación de LDH al medio de cultivo. Los datos representan la media ± la desviación estándar de tres a cuatro experimentos independientes.

5.1.3.2.3. REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE Bcl-2 INDUCIDA POR EL NO EN CÉLULAS RINm5F.

El efecto del SNP y el dbGMPc sobre los niveles de Bcl-2 es mostrado en la Figura 13. La degradación de Bcl-2 inducida por la exposición de las células al SNP no puede ser prevenida por la adición del inhibidor de la PKG (KT-5823), por el contrario la degradación inducida por el dbGMPc es completamente inhibida por el KT-5823

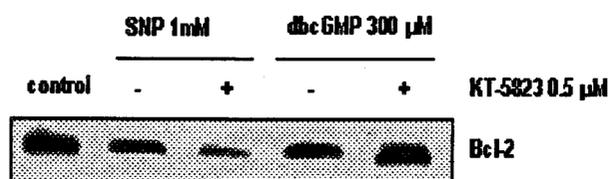


Figura 13. Efecto del KT-5823 sobre la degradación de Bcl-2 inducida por el SNP y el dbGMPc. Las células fueron cultivadas durante 12 horas con las adiciones indicadas en la figura. La figura es representativa de tres experimentos independientes

5.2. EL ÓXIDO NÍTRICO A BAJAS CONCENTRACIONES PROTEGE DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RINm5F

En esta segunda sección vamos a presentar los resultados en los que bajas concentraciones de NO inician la aparición de respuestas anti-apoptóticas. En el primer apartado vamos a caracterizar un sistema apoptótico producido por la retirada de suero del medio de cultivo tomando como referencia a los índices de apoptosis tales como la liberación de citocromo c, la activación de la caspasa 3, la degradación de Bcl-2, y un nuevo índice de apoptosis

relacionado con la capacidad que tienen los homogeneizados de fosforilar a la proteína Bcl-2 cuando ésta se utiliza como sustrato de una reacción de quinasas, a éste índice lo hemos llamado actividad Bcl-2 quinasa. En el segundo apartado presentamos evidencias de que bajas concentraciones de NO pueden contrarrestar los efectos apoptóticos inducidos por la retirada de suero del medio de cultivo. En el tercer apartado presentamos los resultados sobre el sistema de regulación de la respuesta anti-apoptótica inducida por el NO, principalmente relacionados con la participación de la cSrc tirosina quinasa y del sistema sGC/PKG.

5.2.1. LA RETIRADA DE SUERO DEL MEDIO DE CULTIVO INDUCE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RINm5F.

Cuando las células RINm5F fueron cultivadas en un medio de cultivo sin suero, manifiestan características apoptóticas después de las doce horas, tales como la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 3 (Figura 14 A-B).

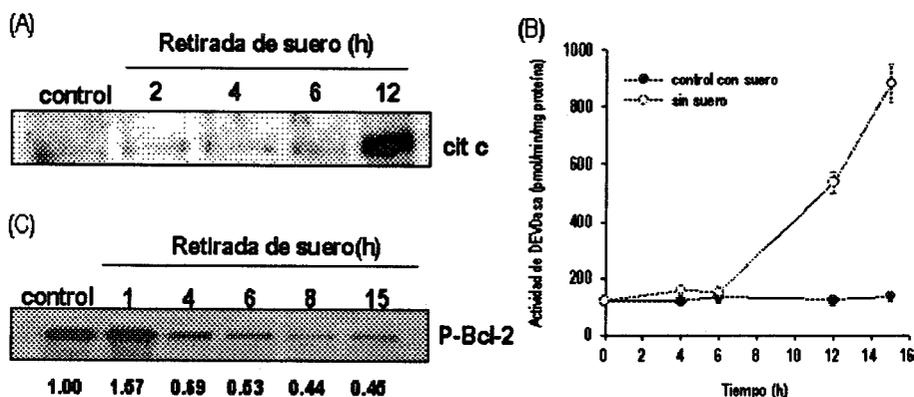


Figura 14. Apoptosis inducida por la retirada de suero en células RINm5F. A. Cinética de liberación de citocromo c desde la mitocondria inducida por la retirada de suero. El citocromo c fue inmunodetectado a partir de la fracción citoplasmática de acuerdo al protocolo que se describe en Materiales y Métodos. B. Efecto de la retirada de suero sobre la actividad de caspasa 3. La actividad de DEVDasa fue medida tal como se describe en Materiales y Métodos. C. Efecto de la retirada de suero sobre la actividad Bcl-2 quinasa. La actividad Bcl-2 quinasa de los homogeneizados de células cultivadas en medio sin suero durante los tiempos indicados fue medida como la incorporación de [γ - 32 P] en la proteína Bcl-2 inmunoprecipitada a partir de células control de acuerdo al procedimiento detallado en Materiales y Métodos. A, C: Las figuras son representativas de 3 experimentos independientes, B: los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La retirada de suero también afecta la actividad Bcl-2-quinasa. La figura 14 C muestra la dependencia de tiempo de la retirada de suero sobre la actividad Bcl-2 quinasa. Se observa que después de un incremento de la fosforilación en la primera hora de la retirada de suero, la actividad Bcl-2-quinasa disminuye hasta un 50 % del control a las 6 horas y permanece así hasta después de las 15 h.

Es importante notar que la disminución de la actividad Bcl-2-quinasa precede a la salida de citocromo c de la mitocondria y a la activación de la caspasa 3.

5.2.2. EL NO SUPRIME EL EFECTO DE LA RETIRADA DE SUERO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS RINm5F

El efecto antiapoptótico de bajas concentraciones de DETA/NO es mostrado en la Figura 15. La viabilidad celular disminuye dramáticamente después de 15 h de la retirada de suero, esta acción es contrarrestada por la adición de DETA/NO 10 μM (Figura 15A). La exposición in vivo al DETA/NO disminuye significativamente la activación de caspasa 3 (Figura 15B); en experimentos in vitro se encontró que la inhibición directa de la actividad de caspasa 3 por el DETA/NO fue solamente aparente a concentraciones superiores a 100 μM (Figura 15C).

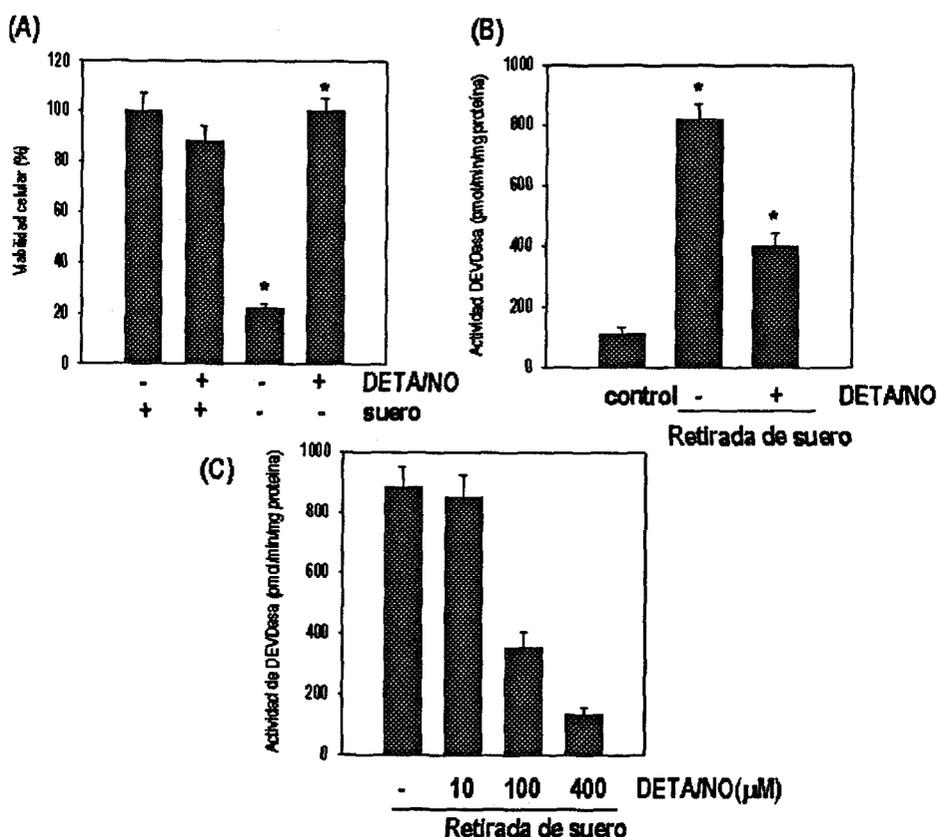


Figura 15. Efecto del NO sobre la viabilidad celular y la actividad de caspasas en células cultivadas en ausencia de suero. A. El NO restaura la viabilidad celular en células crecidas en ausencia de suero. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM . La viabilidad celular fue medida según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. B. El NO disminuye la actividad de caspasa 3 inducida por la retirada de suero. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM . La actividad de DEVDasa fue medida de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. C. Efecto del NO sobre la actividad de caspasa 3. En los homogeneizados provenientes de células que crecieron en medio sin suero fueron expuestos a concentraciones de DETA/NO de 10, 100 y 400 μM . La actividad de DEVDasa fue medida de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. A,B : Los datos representan la media \pm la desviación estándar de 4 experimentos diferentes, * $p \leq 0,005$ con respecto a las células control. C: los datos representan la media \pm la desviación estándar de 3 determinaciones.

Además, tanto la liberación de citocromo c y la degradación de Bcl-2 en células que han crecido en ausencia de suero fueron parcialmente suprimidas por la presencia de

DETA/NO 10 μM (Figura 16A). La actividad Bcl-2 quinasa disminuida por la retirada de suero también fue significativamente restablecida por el DETA/NO 10 μM (Figura 16B)

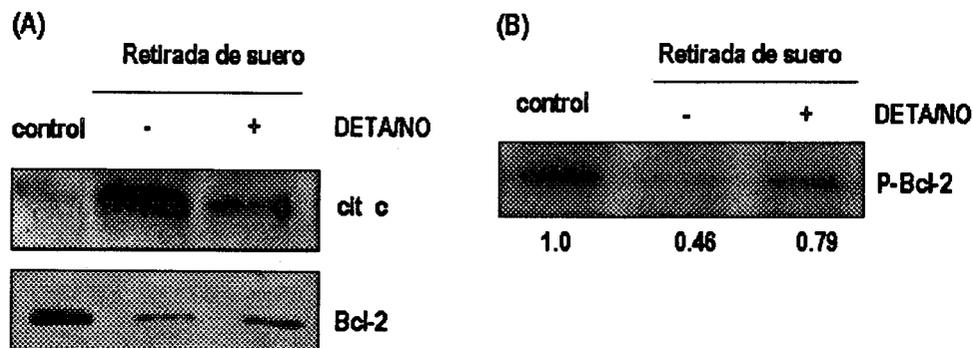


Figura 16. Efecto del NO sobre la liberación de citocromo c, degradación de Bcl-2 y actividad Bcl-2 quinasa inducidas por la retirada de suero. A. La liberación de citocromo c y la degradación de Bcl-2 inducida por la retirada de suero es prevenida por la exposición al NO. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM . La inmunodetección de citocromo c y de Bcl-2 fue realizada según los protocolos descritos en Materiales y Métodos. B. La exposición al NO induce el incremento de la actividad Bcl-2 quinasa en células que crecieron en medio sin suero. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM . La actividad quinasa de los homogeneizados sobre la proteína Bcl-2 inmunoprecipitada fue realizada según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los valores de densidad de la señal en la autoradiografía indican la incorporación de [γ - ^{32}P] en Bcl-2. Los valores fueron normalizados al control que fue definido como 1. Las figuras son representativas de 3 experimentos independientes. Los datos de densidad representan la media \pm la desviación estándar de 3 experimentos diferentes

5.2.3. LA RETIRADA DE SUERO DEL MEDIO DE CULTIVO DESENCADENA LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA DE LA cSrc EN LAS CÉLULAS RINm5F

La Figura 17 A muestra que los niveles de c-Src activa disminuyen notablemente cuando las células son cultivadas en un medio sin suero durante 5 horas. Esta acción fue completamente prevenida cuando se adicionó al medio DETA/NO 10 μM . La c-Src activa fue reconocida por un anticuerpo monoclonal específico anti-c-Src (clon 28) que reconoce la porción carboxilo terminal de la proteína que contiene el residuo tirosina 527 desfosforilado (349). Los niveles totales de c-Src no son afectados según lo que se muestra en la inmunodetección con anticuerpo monoclonal anti-c-Src (Clon 327) que reconoce el dominio BH3 de la proteína. La actividad tirosina quinasa fue medida como la capacidad que tiene la c-Src inmunoprecipitada de fosforilar a la enolasa que se utiliza como sustrato. La figura también muestra que la disminución en la actividad tirosina quinasa inducida por la retirada de suero fue contrarrestada por el DETA/NO 10 μM .

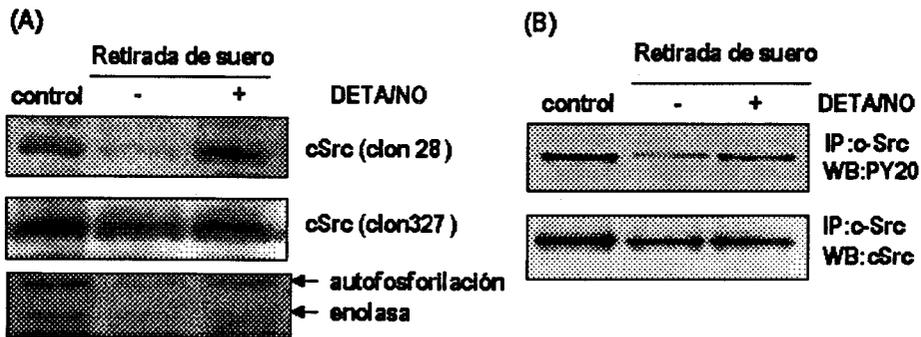


Figura 17 El NO cancela la inhibición de la c-Src tirosina quinasa producida por la retirada de suero. A. La retirada de suero del medio de cultivo y el NO regulan la actividad tirosina quinasa de la c-Src. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 5 horas en ausencia o presencia de DETA/NO 10 μ M. c-Src fue inmunodetectado en los homogeneizados de las células con anti-c-Src clon 28 y anti-c-Src clon 327. La actividad de tirosina quinasa de la c-Src inmunoprecipitada con anti-c-Src clon 28 fue medida por la incorporación de [γ - 32 P] en la enolasa que se utilizó como sustrato y detectada por autoradiografía. B. La actividad de c-Src tiene correlación con su fosforilación en tirosina. La c-Src a partir de los homogeneizados fue inmunoprecipitada con el anti-c-Src clon 327 fue separada e inmunodetectada utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20) o un anti-c-Src clon 327 de acuerdo al protocolo que se describe en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de al menos tres experimentos independientes

La Figura 17 B muestra que la c-Src inmunoprecipitada con el clon 327 a partir de células que crecen en medio que contiene suero presentan altos niveles de fosforilación en residuos de tirosina. La retirada de suero desencadena la disminución de la fosforilación en residuos de tirosina hasta un 52 % del control con suero y este efecto es significativamente prevenida por la adición de DETA/NO al medio. Las inmunodetecciones con el anticuerpo anti-c-Src revelan que la expresión de la proteína no es afectada por estas manipulaciones.

La Figura 18 A muestra que la exposición in vitro de la c-Src inmunoprecipitada al DETA/NO (10 μ M) inicia una activación de la quinasa dependiente del tiempo que esta asociada con el incremento de la capacidad para autofosforilar residuos de tirosina.

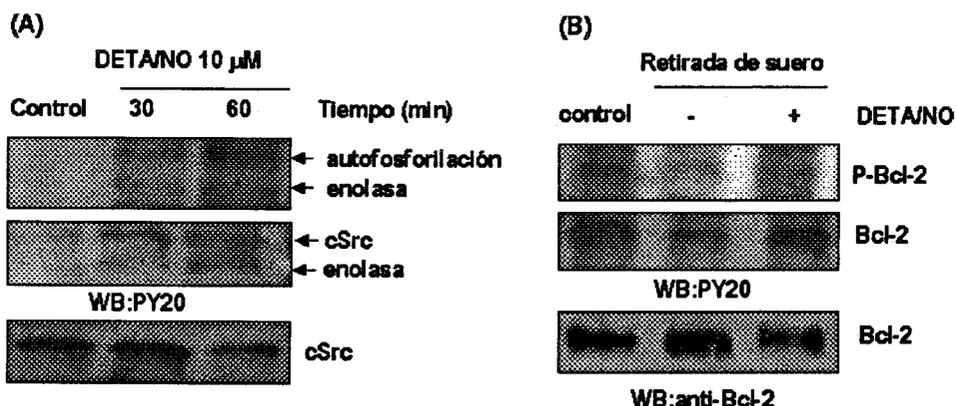


Figura 18. Efecto in vitro del NO sobre la c-Src y Fosforilación de Bcl-2 por la c-Src. A. In vitro activación de la c-Src por el NO. La c-Src fue inmunoprecipitada a partir de homogeneizados provenientes de células que crecieron en medio sin suero durante 5 horas con anti-c-Src clon 327, luego fue incubada en una mezcla de reacción de quinasa que contiene enolasa como sustrato en presencia DETA/NO 10 μ M durante los tiempos indicados, el control fue incubado 60 minutos sin DETA/NO. La incorporación de [γ - 32 P] en la enolasa fue detectada por autoradiografía. La inmunodetección fue realizada con anti-c-Src clon 327 y con anti-fosfotirosina (PY20). Las autoradiografías y las inmunodetecciones fueron realizadas según el protocolo que se describe en Materiales y Métodos. B. Fosforilación de

Bcl-2 por la c-Src. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 5 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μ M. La c-Src fue inmunoprecipitada a partir de los homogeneizados con anti-c-Src clon 28. La c-Src inmunoprecipitada fue incubada en un sistema de reacción de quinasas que contiene como sustrato 10 μ l de Bcl-2 inmunoprecipitada. Superior: autoradiografía representativa de tres experimentos independientes. Media: inmunodetección con anticuerpo anti-fosfotirosina. Inferior: inmunodetección con anticuerpo anti-Bcl-2. Las inmunodetecciones fueron realizadas según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las figuras son representativas de tres experimentos independientes.

La Figura 18B muestra que la c-Src inmunoprecipitada a partir de células que crecieron en medio conteniendo suero promueven la fosforilación de Bcl-2. Esta acción disminuye cuando la proteína es inmunoprecipitada a partir de células que crecieron en medio sin suero y que la adición de DETA/NO 10 μ M a los cultivos previene el efecto de la retirada de suero. Los niveles de fosforilación en residuos de tirosina de la proteína Bcl-2 están correlacionados con el nivel de incorporación de [γ - 32 P] en la proteína.

5.2.4. EL EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DEL NO ES DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE LA c-Src EN LAS CÉLULAS RINm5F.

El efecto de la inhibición de c-Src sobre la acción anti-apoptótica del DETA/NO en células cultivadas en ausencia de suero fue posteriormente estudiada (Figura 19). El DETA/NO fue capaz de suprimir la activación de caspasa 3, la liberación de citocromo c al citoplasma y la degradación de Bcl-2. Estas acciones fueron completamente canceladas por el PP1, un inhibidor de la familia de las c-Src tirosina quinasas (paneles A, B). En adición, la actividad Bcl-2 quinasa inducida por el NO fue completamente suprimida cuando las células crecidas en medio sin suero fueron expuestas al PP1 (panel C).

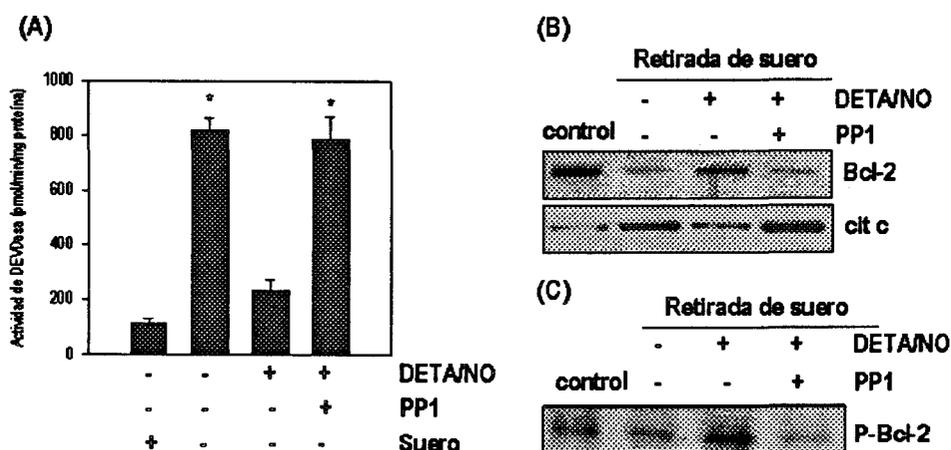


Figura 19. La c-Src regula la apoptosis inducida por la retirada de suero. A. Efecto de la inhibición de la c-Src sobre la actividad de caspasa 3. DEVDasa actividad fue medida en homogeneizados provenientes de células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 h y expuestas a PP1 20 μ M y DETA/NO 10 μ M de acuerdo al protocolo que se describe en materiales y Métodos. B. Efecto de la inhibición de c-Src sobre la prevención liberación de citocromo c y degradación de Bcl-2 inducida por el NO. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas y expuestas a PP1 20 μ M y DETA/NO 10 μ M. La inmunodetección de citocromo c y Bcl-2 fue realizada según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. C. Efecto del PP1 y el DETA/NO sobre la actividad de Bcl-2 quinasa. Las

células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de PP1 20 μM y DETA/NO 10 μM . La actividad de Bcl-2 quinasa fue realizada según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. A: los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes; * $p \leq 0.005$ con respecto a células control. B y C: las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

5.2.5. EL EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DEL NO ES DEPENDIENTE DE sGC/PKG EN LAS CÉLULAS RINm5F.

La Figura 20 (A, B, C) muestra que tanto la inhibición de la guanilato ciclasa soluble con ODQ (10 μM) y la inhibición de la proteína quinasa G con el KT-5823 (0.5 μM) desencadenan la anulación de las acciones del DETA/NO sobre la activación de caspasa 3, liberación de citocromo c, degradación de Bcl-2 y de la actividad de Bcl-2 quinasa en células crecidas en medio sin suero.

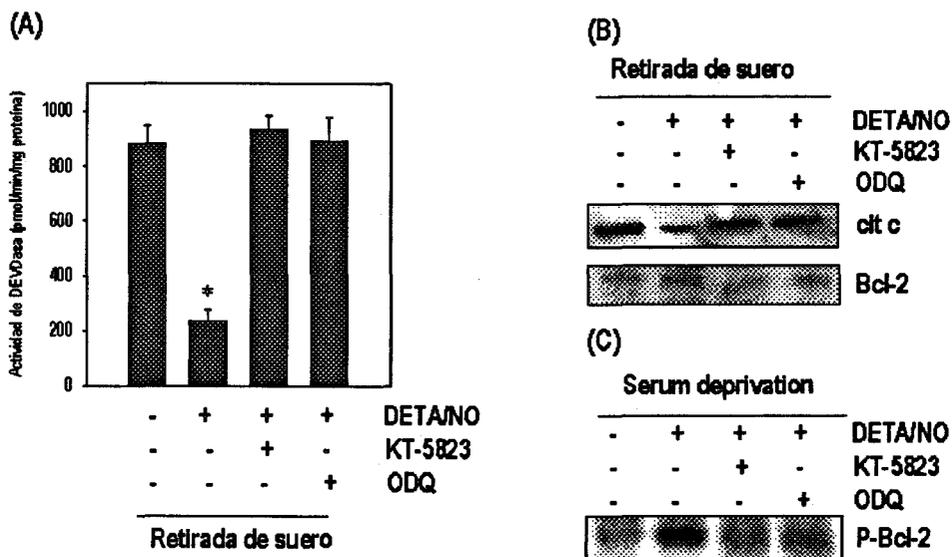


Figura 20. El efecto antiapoptótico del NO ocurre de una manera dependiente de GMPc. A. Efecto de los inhibidores del sistema sGC/PKG sobre la actividad de caspasa inducida por la retirada de suero. La actividad de DEVDasa fue medida en homogeneizados provenientes de células cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM , ODQ 10 μM y KT-5823 0.5 μM según se describe en Materiales y Métodos. B. Efecto de los inhibidores de la vía del GMPc sobre la prevención de la liberación de citocromo c y degradación de Bcl-2 inducida por el NO. La inmunodetección de citocromo c y Bcl-2 fueron realizadas a partir de células cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM , ODQ 10 μM y KT-5823 0.5 μM según como se detalla en Materiales y Métodos. C. Dependencia de la actividad Bcl-2 quinasa del sistema sGC/PKG. Las células fueron cultivadas en medio sin suero durante 15 horas en presencia o ausencia de DETA/NO 10 μM , ODQ 10 μM y KT-5823 0.5 μM . La fosforilación de Bcl-2 inmunoprecipitada fue realizada según el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. A: los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes; * $p \leq 0.005$ con respecto a células control. B y C: las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

5.2.6. LA ACTIVIDAD DE LA PKG ESTÁ REGULADA POR LA c-Src EN CÉLULAS RINm5F.

La Tabla 1 muestra que la retirada de suero del medio de cultivo produce una disminución de la actividad de la PKG en un 68 %. La adición de DETA/NO a los cultivos revierte esta acción. La adición de PP1 desencadena la supresión del efecto del NO, lo que sugiere que la c-Src media el efecto estimulador del NO sobre la PKG.

Tabla 1. Actividad de PKG inducida por el DETA/NO es dependiente de cSrc. La actividad de PKG fue medida en homogeneizados provenientes de células cultivadas en medio sin suero durante 15 horas y expuestas a PP1 20 mM y DETA/NO 10 mM como se indica en Materiales y Métodos. Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes; * $p \leq 0.005$ con respecto a células control.

Condiciones	Actividad de PKG (pmol/min./mg de proteína)
Control	1218 \pm 163.5
Retirada de suero	392 \pm 34,1*
Retirada de suero + DETA/NO	1088 \pm 181,4
Retirada de suero + DETA/NO + PP1	442 \pm 81,2*

6. DISCUSIÓN

En los últimos años se han acumulado evidencias concernientes al papel de la apoptosis en el control de la población de células beta en la patogénesis de la IDDM (5, 252, 354, 355, 356). Así se ha visto que la apoptosis en células beta de roedores está mediada por la generación de óxido nítrico (NO) en un proceso regulado por citoquinas inflamatorias (252, 256, 357, 358). Sin embargo respecto al papel del NO en el control de la apoptosis se han encontrado varios mecanismos por los que altas concentraciones de NO la inducen y bajas concentraciones la previenen.

En la primera parte de esta tesis mostramos que altas concentraciones de NO inducen la muerte celular por apoptosis en las células productoras de insulina RINm5F. Nuestros resultados indican que altas concentraciones de NO inducen la activación de acciones proapoptóticas como la fragmentación de ADN, activación de caspasa 3, liberación de citocromo c, y degradación de Bcl-2. Además induce la activación de acciones antiapoptóticas como la activación de la PKG. Debido a su mayor intensidad las acciones proapoptóticas predominan sobre las acciones antiapoptóticas. Las acciones proapoptóticas son independientes del sistema de señalización sGC/PKG, aun más nuestros resultados muestran que los índices apoptóticos aumentan de magnitud cuando en condiciones de apoptosis se inhibe la actividad de la PKG con el KT-5823, indicando que el NO activa a la PKG como parte de una respuesta anti-apoptótica. En estudios comparativos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando donadores de NO y el atracilósido encontramos que la regulación de la liberación de citocromo c por las mitocondrias es un elemento crítico en la apoptosis inducida por el NO y que dicha acción está relacionada con mecanismos dependientes de la apertura del poro de membrana responsable de la permeabilidad transitoria (PT) de la mitocondria.

Previamente se han reportado una serie de evidencias de que bajas concentraciones de NO protege de la apoptosis en diversos sistemas celulares (296, 299, 306), a este respecto no existen estudios en células beta.

En la segunda parte de esta tesis mostramos que la retirada de suero del medio de cultivo induce la muerte celular por apoptosis en células productoras de insulina RINm5F, la apoptosis fue seguida a través del estudio de índices como la liberación de citocromo c de la mitocondria, activación de caspasa 3, degradación de Bcl-2 y un nuevo índice llamado actividad de Bcl-2 quinasa, que consiste en determinar la capacidad que tienen los homogeneizados de fosforilar a Bcl-2 inmunoprecipitada. Nuestros resultados muestran por primera vez que bajas

concentraciones de DETA/NO (10 μ M) inducen la reducción de la liberación de citocromo c, disminución de la activación de caspasa 3, prevención de la degradación de Bcl-2 y aumento de la actividad Bcl-2 quinasa; Estudios con inhibidores del sistema sGC/PKG, el ODQ y el KT 5823, revelan que estas acciones son dependientes de la activación de la sGC y de la PKG. El DETA/NO induce la autofosforilación de la c-Src tanto *in vivo* como *in vitro* y la c-Src activa es capaz de inducir la fosforilación en tirosina de Bcl-2 *in vitro*. Debido a que la inhibición de la c-Src por el PP1 cancela las acciones del DETA/NO sobre la activación de la PKG, disminución de la activación de caspasas, disminución de la liberación de citocromo c de la mitocondria, prevención de la degradación de Bcl-2, e incremento de la actividad de Bcl-2 quinasa, proponemos que tanto la generación de GMPc y la activación de la c-Src son requeridos para la señalización de las acciones antiapoptóticas del NO sobre la mitocondria.

Las acciones del NO sobre la apoptosis dependen del tipo de célula, de las concentraciones utilizadas, de la interacción con otros radicales y del estado redox de la célula (248-303). En las células beta pancreáticas la apoptosis está controlada por el GMPc de distinta manera. Se ha reportado que el GMPc está involucrado en la apoptosis inducida por el NO en células HIT-15T (253). De hecho, nuestros resultados indican que en las células RINm5F, que cuentan con un sistema sGC/PKG, al ser expuestas a concentraciones 1 mM de SNP, un donador de NO, comienza una activación inicial de sGC seguida por una disminución de la actividad cuando los periodos de exposición son largos. Estos resultados están de acuerdo con otros reportados en células de músculo liso, donde la actividad y la estabilidad del ARN mensajero de la sGC disminuye cuando son expuestas al NO (351, 352). Por otro lado, la exposición al NO inicia un incremento sostenido en la actividad de la PKG que fue resistente a ser bloqueada por el ODQ, un inhibidor de la sGC, es posible que inicialmente la activación de la PKG esté mediada por más de una señal, una de las cuales es dependiente de GMPc, lo que explicaría la subida inicial mostrada en la figura 10 y la posterior disminución a las cuatro horas que es consistente con la disminución de la actividad de la sGC, la segunda señal sería la responsable del mantenimiento y posterior subida de la actividad a tiempos mayores de cuatro horas. Es totalmente posible que cuando las células son expuestas durante periodos largos al NO la activación de la PKG sea a través de mecanismos independientes del GMPc tal como la fosforilación (309). La disminución observada a las cuatro horas se explica a que la activación de la PKG inducida por fosforilación es de mayor intensidad que la inducida por el GMPc y a la diferente capacidad de unir GMPc que presenta la PKG dependiendo del tipo mecanismo de activación (309, 333, 336, 337)

Nuestros resultados también indican que la exposición al NO además de la apoptosis promueve secundariamente la muerte celular por necrosis y que estas acciones son reproducidas por el

dbGMPc, un análogo permeable del GMPc. Los inhibidores de la PKG son capaces de contrarrestar estas acciones del dbGMPc sobre la muerte celular por apoptosis y necrosis, pero no pueden bloquear las acciones del NO sobre la apoptosis. Estos hallazgos hablan a favor de la idea de que la apoptosis iniciada por altas concentraciones de NO en células RINm5F es independiente del GMPc. Nosotros también encontramos que la liberación de LDH, un indicador de muerte por necrosis, es dependiente de GMPc. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los de viabilidad celular realizados en las células HIT-15T (253) y sugieren que el GMPc puede controlar los procesos que desencadenan la muerte celular por necrosis en células pancreáticas.

La liberación de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma ha sido involucrada en el control de la activación de caspasas durante la apoptosis (45, 63, 66–68, 71, 79, 172, 178, 182, 187, 191, 348). El NO generado tanto endógenamente por la exposición de las células a la IL-1 β y exógenamente por donadores químicos provocan la liberación de citocromo c de la mitocondria en células RINm5F. De hecho, se ha visto que este orgánulo juega un importante papel en el control de la apoptosis inducida por el NO en las células RINm5F puesto que tanto la activación de la caspasa 3 inducida por el NO y la fragmentación de ADN fueron precedidas por la aparición de citocromo c en el citoplasma. Actualmente se conoce que la activación de caspasas efectoras y la apoptosis nuclear están controladas por factores apoptogénicos tales como la liberación de citocromo c, liberación de AIF, liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria por mecanismos que incluyen la apertura del PT (113, 114, 173, 193, 195). En experimentos *in vitro* con mitocondrias aisladas encontramos que tanto el NO y el atractilósido, un conocido inductor del PT, inducen el hinchamiento de la mitocondria y la liberación de citocromo c; y en experimentos *in vivo* el atractilósido tiene un comportamiento similar al NO induciendo la liberación de citocromo c y la activación de caspasa 3, todas estas acciones tanto *in vitro* como *in vivo* son contrarrestadas por el efecto de la CsA un conocido inhibidor del PT (194) estos resultados apoyan el concepto de que el NO induce la liberación de citocromo c mediante mecanismos que involucran la apertura del PT mitocondrial (164, 273-276). Además los experimentos de actividad metabólica mitocondrial presentados en la figura 5 muestran que ésta disminuye cuando las células son expuestas a diferentes donadores de NO indicando que puede haber comprometidos más de un mecanismo en la salida del citocromo c además del efecto sobre el PT. Estos mecanismos adicionales pueden estar relacionados con los cambios inducidos en la mitocondria debidos a la disminución de su nivel energético que son dependientes de la inhibición de la respiración mitocondrial probablemente debido a la S-nitrosilación de proteínas claves o a la competencia por el oxígeno entre el NO y la citocromo c

oxidasa (281-283), ambas posibilidades pueden ser dependientes o independientes de la apertura del PT (279-283).

La posibilidad de que la degradación de Bcl-2 fuera secundaria a la apertura del PT mitocondrial por el NO fue estudiada utilizando un inhibidor general de caspasas el Z-VAD.FMK. Mientras que el Z-VAD.FMK no contrarresta completamente la liberación de citocromo c, sí previene completamente la degradación de Bcl-2. Esto sugiere que las caspasas inhibidas por el Z-VAD.FMK participan en la amplificación de las acciones del NO a nivel mitocondrial. Estos resultados son consistentes con los reportados previamente (348) que inducen a la liberación de citocromo c es una acción primaria en la apoptosis y con hallazgos en que se muestran una intensificación de la señal apoptótica por acción de la caspasa 3 (121).

Hay evidencias de que bajas concentraciones de NO incrementan la expresión de Bcl-2 de manera dependiente de GMPc (296). Aunque una acción similar en las células RINm5F no ha sido descrita, nuestros resultados indican que durante la acción apoptótica de altas concentraciones de NO se produce la degradación de Bcl-2, la que es secundaria a la activación de caspasas. Los mecanismos que regulan la degradación de Bcl-2 no se conocen en detalle, pero el hecho de que sea secundaria a la activación de la caspasa 3 apoya la idea de que Bcl-2 puede ser una proteína blanco de la caspasa 3. Tampoco podemos dejar de lado que sean otros los mecanismos que participen en la degradación de Bcl-2, estos pueden estar relacionados con modificaciones postraduccionales inducidas por señales apoptóticas o por el NO. Se ha propuesto en este sentido que la desfosforilación de Bcl-2 la hace susceptible a ser degradada por el complejo proteosoma dependiente de ubiquitina (165) y que altas concentraciones de NO y peroxinitrito provoquen la oxidación de Bcl-2 facilitando su degradación por la maquinaria de recambio proteínas de la célula incluido el complejo proteosoma dependiente de ubiquitina. Además, los hallazgos de que la inhibición de la PKG con el KT5823 contrarrestan la degradación de Bcl-2 inducida por el dbGMPc pero fallan para bloquear la degradación de Bcl-2 inducida por el NO indican que el sistema sGC/PKG no está involucrado en la acción del NO sobre la concentración de la proteína Bcl-2, pero también indican, en el caso del dbGMPc de que hay un sistema de transducción de señales que está comprometido en la regulación de la cantidad de Bcl-2.

En los resultados mostrados en las figuras 11A, 12A y 13 se observa que cuando la PKG es inhibida con el KT-5823, la magnitud de los índices apoptóticos se incrementan. Estos resultados aparentemente contradictorios están directamente relacionados con el hecho de que altas concentraciones de NO están activando tanto respuestas proapoptóticas como antiapoptóticas, y que el efecto final está desplazado hacia la pro-apoptosis, sin embargo hay señales

antiapoptóticas que las están atenuando, una de éstas señales es la activación de la PKG inducida por el NO. Éste es un aspecto que no ha sido abordado hasta ahora. Debido a la complejidad experimental que significa el estudiar la presencia de dos tipos señalización inducidas por el NO, caracterizamos un sistema en que el NO sólo active las señales antiapoptóticas, los resultados encontrados son presentados a continuación.

En conclusión en esta primera parte, nuestros resultados sugieren que altas concentraciones de NO producen cambios en la mitocondria dependientes de la apertura del PT y de la disminución de la actividad metabólica mitocondrial que promueven la liberación de citocromo c desencadenando la muerte celular por apoptosis y que estas acciones ocurren de una manera independiente del sistema sGC/PKG.

Previamente se ha reportado que el NO generado por el SNAP a concentraciones superiores a 50 μM previenen la apoptosis por la inhibición directa de la actividad de caspasa 3 (84, 85, 294, 297, 304, 305), prevención de la degradación de Bcl-2 y liberación de citocromo c (289, 294, 299, 306). Estas acciones antiapoptóticas están ligadas a los cambios del estado redox de las células dependientes del NO (246, 293, 358). En experimentos realizados con bajas concentraciones de donadores de NO se ha encontrado que la inhibición de la activación de caspasa 3, prevención de la liberación de citocromo c y la inducción del RNA mensajero y proteínas de Bcl-2 son dependientes de la generación de GMPc (296, 299). De hecho, bajas concentraciones de NO son capaces de estimular la producción de GMPc in las células HIT 15 y RINm5F (359). Nosotros mostramos aquí que bajas concentraciones de DETA/NO (10 μM) protegen a las células RINm5F de la apoptosis causada por la retirada de suero del medio de cultivo. Puesto que la cinética de liberación de NO por el DETA/NO muestra una producción sostenida hasta por periodos mayores de 20 horas (360), en nuestro modelo experimental la exposición continua a bajas concentraciones de DETA/NO es capaz de activar el sistema sGC/PKG. El papel para el sistema sGC/PKG en la acción anti-apoptótica del NO está sustentada en los hallazgos que tanto la inhibición de la sGC y la PKG contrarrestan completamente la prevención de la liberación de citocromo c, prevención de la degradación de Bcl-2, inhibición de la activación de caspasa 3 y el incremento de la actividad de Bcl-2 quinasa inducidas por el NO. Para determinar que la protección de la apoptosis por bajas concentraciones de NO es independiente de la modificación la función de las caspasas por S-nitrosilación de sus grupos tioles, como ha sido propuesto (307, 308), nosotros primero evaluamos si el NO inhibe directamente la actividad de caspasa 3. Nuestros resultados indican que concentraciones superiores a 100 μM de DETA/NO son necesarias para inhibir sustancialmente la actividad de caspasa 3 in vitro, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos por los que bajas concentraciones de NO bloquean las

acciones proapoptóticas inducidas por la retirada de suero. Nosotros por lo tanto estudiamos las acciones anteriores que causan la respuesta antiapoptóticas de bajas concentraciones de NO. En algunos sistemas celulares, la fosforilación de Bcl-2 es requerida para la señalización de la apoptosis (151-157). En otros sistemas, el incremento de la fosforilación de Bcl-2 está relacionada con la protección a la apoptosis, y se ha descrito que están involucradas tanto la fosforilación en serina 70 dependiente de la proteína quinasa C (PKC) y de la serina 87 dependiente de la MAPK (158-161). Nuestras observaciones de que la disminución en el grado de fosforilación de la proteína Bcl-2 es una acción temprana asociada con la apoptosis inducida por retirada de suero del medio de cultivo nos llevó a estudiar el papel de las quinasas en la respuesta anti-apoptótica iniciada por el NO. La exposición de las células que crecen en medio sin suero a concentraciones de 10 μ M de DETA/NO recupera el nivel de fosforilación de la proteína Bcl-2 inmunoreactiva.

Los hallazgos de que el PP1, un inhibidor de la c-Src, revierte las acciones antiapoptóticas del NO nos llevó a estudiar el papel de la c-Src en este proceso. Además, nuestros resultados muestran que el NO activa la c-Src tirosina quinasa tanto in vitro como in vivo y estas acciones están asociadas tanto con el incremento de la fosforilación en residuos de tirosina y la autofosforilación de la c-Src. Hay reportes que indican que tanto los residuos de cisteína y de tirosina de las c-Src tirosina quinasas son blancos preferenciales del NO y del peroxinitrito y además, la modificación de estos residuos reguladores puede explicar la autofosforilación y la activación de la quinasa (306, 307). Nosotros también encontramos que la c-Src activa es capaz de inducir in vitro la fosforilación en tirosina de la proteína Bcl-2 inmunoprecipitada. Nosotros además proponemos que la activación directa de la c-Src por el NO participa en la fosforilación de Bcl-2 durante la anti-apoptosis. Las acciones antiapoptóticas inducidas por el NO fueron completamente bloqueadas por los inhibidores del sistema de la sGC/PKG, el ODQ y el KT-5823 respectivamente. Por ello, tanto la c-Src tirosina quinasa y el sistema sGC/PKG son requeridos en la señalización anti-apoptótica inducida por el NO. El hallazgo de que tanto la activación de la PKG y la fosforilación de Bcl-2 dependientes del NO son completamente bloqueados por el inhibidor de la c-Src tirosina quinasa, el PP1, sugiere que la fosforilación de Bcl-2 inducida por el NO depende de la cooperación tanto de tirosina y serina/treonina proteína quinasas.

7. CONCLUSIONES

1. **Altas concentraciones de NO inducen apoptosis en células RINm5F**
2. **El NO induce la apertura del poro responsable de la permeabilidad transitoria de la mitocondria y una disminución de la actividad metabólica mitocondrial.**
3. **La liberación de citocromo c de la mitocondria inducida por el NO está mediada por mecanismos dependientes de la apertura del PT. Otros mecanismos, tales como los dependientes de la disminución del estado energético de la mitocondria pueden estar involucrados en este proceso.**
4. **La liberación de citocromo c inducida por altas concentraciones de NO desencadena la muerte celular por apoptosis, la que ocurre de manera independiente del sistema sGC/PKG**
5. **La retirada de suero del medio de cultivo induce la muerte celular por Apoptosis en células RINm5F.**
6. **La actividad de Bcl-2 quinasa disminuye en la apoptosis inducida por la retirada de suero**
7. **Bajas concentraciones de NO protegen a las células RINm5F de la apoptosis inducida por la ausencia de suero.**
8. **Bajas concentraciones de NO restablecen la actividad de Bcl-2 quinasa**
9. **La respuesta antiapoptótica inducida por el NO es dependiente de la vía del sGC/PKG**
10. **El NO activa la c-Src tirosina quinasa in vivo e in vitro**
11. **La activación de la c-Src inducida por el NO está correlacionada con su incremento en la fosforilación de sus residuos de tirosina**
12. **La c-Src tirosina quinasa produce la fosforilación de Bcl-2 en sus residuos de tirosina**
13. **La activación de la PKG es dependiente de la generación de GMPc y de la activación de la de la c-Src.**

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999 Cell death in development. *Cell* 96:245-2554; Rich T, et al. 1999. Apoptosis: the germs of death. *Nat. Cell. Biol.* 1:E69-E71
2. Song Z, S  ller H. 1999. Death by design: mechanism and control of apoptosis . *Trends Cell Biol.* 9:M49-M52
3. Jacobson MD, et al. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354
4. Thompson, CB. 1995. Apoptosis in the patogénesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462
5. Kay TWH, Thomas HE, Harrison LC, Allison J. 2000. The beta cell in autoimmune diabetes: many mechanism and pathways of loss. *Trends Endocrinol Metab.* 11:11-15
6. Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with widw ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257
7. McConkey DJ, Orrenius S. 1994. Calcium and cyclosporin A in the regulation of apoptosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 200:95-105
8. Horvitz HR, 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res. (suppl.)* 59:1701s-1706s
9. Ellis RE, Jacobson D, Horvitz HR. 1991. Genes requiered for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129:79-94
10. Yuan J,Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mamalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652
11. Yuan J, Horvitz HR 1993. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116:309-320
12. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. 1992 *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature.* 356:494-499
13. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. 1997 Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science.* 275:1122-1126
14. Chinnaiyan AM, Chaudhary D, O'Rourke K, Koonin EV, Dixit VM. 1997. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature.* 388:728-729
15. Del Peso L, Gonzales VM, Inohara N, Ellis RE, N  n  ez G. 2000 Disruption of the CED-9/CED-4 complex by EGL-1 is a critical step for Programmed cell death in *C. elegans*. *J. Biol.. Chem.* 275:27205-27211
16. Conradt B, Horvitz HR. 1998. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9 *Cell.* 93:519-529

17. Del Peso L, Gonzales VM, Núñez G. 1998. *Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J. Biol. Chem.* 273:33495-33500
18. Hengartner MO, Horvitz HR. 1994. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-676
19. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90:405-413
20. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. 1998. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* 273:5841-5845
21. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 17:3237-3245.
22. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171
23. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian Caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:383-424
24. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *The Journal of Biological Chemistry.* 272 : 9677-9682l
25. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911
26. Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1-16
27. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 12:806-819
28. Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:299-306
29. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343-352
30. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 370:270-275
31. Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol.* 3:619-625

32. Mittl PR, Di Marco S, Krebs JF, Bai X, Karanewsky DS, Priestle JP, Tomaselli KJ, Grutter MG. 1997. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem.* 272:6539-6547.
33. Gu Y, Wu J, Faucheu C, Lalanne JL, Diu A, Livingston DJ, Su MS. 1995. Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. *EMBO J.* 14:1923-1931
34. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1:949-957
35. Stennicke HR, Salvensen GS. 1998. Properties of the caspases. *Biochim. et Biophys. Acta*1387:17-31
36. Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, Black RA. 1990. Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem.* 265:14526-14528
37. Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjoco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, et al. 1991. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol.*;147:2964-2969
38. Martins LM, Kottke T, Mesner PW, Basi GS, Sinha S, Frigon N Jr, Tatar E, Tung JS, Bryant K, Takahashi A, Svingen PA, Madden BJ, McCormick DJ, Earnshaw WC, Kaufmann SH. 1997. Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:7421-7430
39. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem.* 251:98-102
40. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 85:803-815
41. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 85:817-827
42. Kumar S, Colussi PA. 1999. Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 24: 1-4
43. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8395-8400
44. Faleiro L, Kobayashi R, Fearnhead H, Lazebnik Y. 1997. Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J.* 16:2271-2281
45. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479-489

46. Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.* 273:27084-27090
47. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-2804
48. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 81:505-512
49. Bang S, Jeong EJ, Kim IK, Jung YK, Kim KS. 2000. Fas- and TNF-mediated apoptosis use the same binding surface of FADD to trigger a signal transduction: a typical model for convergent signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2000 in press
50. Yang X, Chang HY, Baltimore D. 1998. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell.* 1:319-325
51. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 273:2926-2930
52. Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. 1998. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* 273:4345-4349
53. MacCorkle RA, Freeman KW, Spencer DM. 1998. Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3655-3660
54. Tatsuta T, Shiraishi A, Mountz JD. 2000. The prodomain of caspase 1 enhances Fas-mediated apoptosis through facilitation of caspase 8 activation. *J. Biol. Chem.* 275:14248-14254
55. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 81:495-504
56. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 81:513-523
57. Duan H, Dixit VM. 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature.* 385:86-89
58. Grimm S, Stanger BZ, Leder P. 1996. RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10923-10927
59. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 57:615-619
60. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. 2000. FADD/MORT1 and caspase 8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12:599-609

61. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase 8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12:611-620
62. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 275:1129-1132
63. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275:1132-1136
64. Chmura SJ, Nodzenski E, Kharbanda S, Pandey P, Quintans J, Kufe DW, Weichselbaum RR. 2000. Down-regulation of ceramide production abrogates ionizing radiation-induced cytochrome c release and apoptosis. *Mol Pharmacol*. 57:792-796
65. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. 1997. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:6939-6942
66. Kluck RM, Ellerby LM, Ellerby HM, Naiem S, Yaffe MP, Margoliash E, Bredesen D, Mauk AG, Sherman F, Newmeyer DD. 2000. Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J. Biol. Chem*. 275:16127-12133
67. Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Núñez G. 2000. Expresión and functional análisis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is requered for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase 9. *J. Biol. Chem*. 275: 8461-8468
68. Jiang X, Wang X. 2000. Cytocrome c promotes caspase 9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem*. En prensa.
69. Genine D, Budihardjo I, Plunkett W, Wang X, Carrera CJ, Cottam HB, Carson DA, Leoni LM. 2000. Nucleotide requeriments for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J. Biol. Chem*. 275:29-34
70. Qin h, Srinivasula SM, Wu G, Fernández-Alnemri T, Anemri ES, Shi Y. 1999. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399:549-557
71. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem*. 274:17941-17945
72. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active aproximately 700-kDa and inactive appromately 1.4-Mda apoptosome complexes. *J. Biol. Chem*. 2000, 275:6067-6070
73. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell. Biol*. 2:469-475
74. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell. Biol*. 2:476-483

75. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 15:4310-4322
76. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14486-14491
77. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. 1997. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem.* 272:2952-2956
78. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:7464-7469
79. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.* 144:281-292
80. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. 1996. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10:587-597
81. Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, Okubo T. 1996. Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 229:21-26
82. Tamura T, Ishihara M, Lamphier MS, Tanaka N, Oishi I, Aizawa S, Matsuyama T, Mak TW, Taki S, Taniguchi T. 1995. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature.* 376:596-599
83. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. 1997. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science.* 278:1630-1632
84. Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM. 1997. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:419-424
85. Mohr S, Zech B, Lapetina EG, Brüne B. 1997. Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation caused by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 238:387-391
86. Rössig L, Fichtlscherer B, Britschop K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S. 1999. Nitric oxide inhibits caspase-3 by s-nitrosilation in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:6823-6826
87. Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 10:262-267
88. Martins LM, Kottke TJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC. 1998. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood.* 92:3042-3049

89. Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, Mattmann C, Tschopp J. 1998. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol.* 8:885-888
90. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvensen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321
91. Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nuñez G. 1997. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10717-10722
92. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol.* 10:552-558
93. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274:1541-1548
94. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszka DG, WU H. 2000. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 101:777-787
95. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvensen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925
96. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JI. 1997. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1172-1176
97. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM. 1997. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:9621-9624
98. Zhou Q, Salvensen GS. 2000. Viral caspase inhibitors CrmA and p35. *Methods Enzymol.* 322:143-154
99. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvensen GS, Pickup DJ. 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell.* 69:597-604
100. Deveraux QL, Takahashi R, Salvensen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388:300-4
101. Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Salvensen GS, Stennicke HR, Hammock BD, Reed JC. 2000. Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1427-1432
102. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.* 83:1243-1252
103. Hozak RR, Manji GA, Friesen PD. 2000. The BIR motifs mediate dominant interference and oligomerization of inhibitor of apoptosis Op-IAP. *Moll. Cell Biol.* 20:1877-1885

104. Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-252
105. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17:2215-2223
106. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53:4701-4714
107. Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 3:614-612
108. Desagher S, Martinou JC. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10:369-377
109. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. 1997. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 277:370-372
110. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. 1997. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:11357-11362
111. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nuñez G. 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4386-4391
112. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. 2000. Bcl-X_L does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* 4:402-407
113. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42
114. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. 2000. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J. Biol. Chem.* In press
115. Jonson DE. 1998. Regulation of survival pathways by IL-3 and induction of apoptosis following IL-3 withdrawal. *Frontiers in Biosciences.* 3:d313-d324
116. Tsujimoto Y, Shimizu S. 2000. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters* 466:6-10
117. Kelekar A, Thompson CB. 1998. Bcl-2-family proteins:the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8:324-330
118. Wang HG, Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, Hovey L 3rd, Troppmair J, Rapp UR, et al. 1994. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene.* 9:2751-2756
119. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. 1997. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 386:728-731

120. Hunter JJ, Bond BL, Parslow TG. 1996. Functional dissection of the human Bcl-2 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 16:877-883
121. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 278:1966-1968
122. Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326
123. Tsujimoto Y. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.* 3:697-707
124. Song Q, Kuang Y, Dixit VM, Vincenz C. 1999. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J.* 18:167-178
125. Reed JC. 1998 Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236
126. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science.* 275:983-986
127. Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM. 1996. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature.* 379:554-556
128. Simonian PL, Grillot DA, Nuñez G. 1997. Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2. *Oncogene.* 15:1871-1875
129. Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ. 1998. Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol.* 18:6083-6089
130. Knudson CM, Korsmeyer SJ. 1997. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet.* 16:358-363
131. Longo VD, Ellerby LM, Bredesen DE, Valentine JS, Gralla EB. 1997. Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol.* 137:1581-1588
132. Jürgensmeier JM, Krajewski S, Armstrong RC, Wilson GM, Oltersdorf T, Fritz LC, Reed JC, Oltzie S. 1997. Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell.* 8:325-339
133. Schendel SL, Montal M, Reed JC. 1998. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 5:372-380
134. Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. 1997. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 272:24101-24104
135. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. 1998. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* 8:779-782

136. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91:231-241
137. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. 1996. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87:629-638
138. Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ. 1999. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*. 3:413-422
139. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X. *Cell*. 87:619-628.
140. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 2000. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*. 6:41-51
141. Lou X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94:481-490
142. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. 2000. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of Bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J. Biol. Chem*. 275:21648-21652
143. Naumovski L, Cleary ML. 1996. The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol*. 16:3884-3892
144. Roth W, Grimm C, Rieger L, Strik H, Takayama S, Krajewski S, Meyermann R, Dichgans J, Reed JC, Weller M. 2000. Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. *Brain Pathol*. 10:223-234
145. Wang HG, Reed JC. 1998. Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors*. 8:13-16
146. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 381:335-341
147. Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J, Wagner G. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*. 96:615-624
148. McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*. 96:625-634
149. Minn A, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore S, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 385:353-357
150. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. 1997. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5113-5118

151. Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD, Pietenpol JA. 1998. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progresión and taxol-induced growth arrest. *J. Biol.Chem.* 273:30777-30784
152. Yamamoto K, Ichijo H, Koremeyer SJ. 1999. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G₂/M. *Mol. Cell. Biol.* 19:8469-8478
153. Goodwin FM, Vu T, Brantley-Finley C, Gaarde WA, Chambers TC. 2000. Vinblastine-induced phosphorilation of bcl-2 and Bcl-XL are mediated by JNK and occur in parallel with inactivation of Raf-1/MEK/ERK cascade. *J. Biol Chem.* En prensa
154. Ling Y-H, Tornos C, Perez-Soler R. 1998. Phosphorylation f Bcl-2 is a marker of M phase and not a determinant of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:18984-18991
155. Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. 1996. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represent a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research.* 56:1851-1854
156. Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H, Kano Y, Matsuda M. 2000. Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G₂/M phases and its role in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* 275:21661-21667
157. Srivastava RK, Mi Q-S, Hardwick JM, Longo DL. 1999. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3775-3780
158. May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA, Davidson NE. 1994. Interleukin-3 and bryostatín-1 mediate hyperphosphorylation of Bcl-2 in association with supresión of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 269:26865-26870
159. Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. 1998. A functional role for mitochondrial protein kinase Ca in Bcl-2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273:25436-25442
160. Ito T, Deng X, Carr B, May WS. 1997. Bcl-2 phosphorylation requerid for anti-apoptosis function. *J. Biol Chem.* 272:11671-11673
161. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ, 1997. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activation mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis *J. Biol. Chem.* 272:19022-19026.
162. Haendeler J; Messmer UK, Bruñe B, Neugebauer E, Dimmeler S. 1996. Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock* 6:405-409
163. Paradis E, Doulliard H, Koutroumanis M, Goodyear C, LaBlanc A. 1996. Amyloid β peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expresión in human neurons. *J. Neurosci.* 16:7533-7539
164. Tejedo J, Bernabé JC, Ramírez R, Sobrino F, Bedoya FJ. 1999. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria wich precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Lett.* 459:238-243
165. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. 1999. Dephosphorilation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: link between the apoptosome and the proteosome pathway. *J. Exp. Med.* 189:1815-1822

166. Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S. 2000. Posttranslational modifications of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: Molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1886-1896
167. Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC Jr, Boyd D, Mills GB. 1999. Regulation of Bad phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 18:6635-6640
168. Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. 2000. Regulation of Bad by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of novel site, Ser155. *Biochem. J.* 349:547-557
169. Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM. 2000. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonista Bad and protects cells from apoptosis. *Moll. Cell. Biol.* 20:453-461
170. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339-343
171. Downward J. 1999. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol.* 1:E33-E35
172. Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. 1994. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requeriment for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell.* 79:353-364
173. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. 2000. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* 476:118-123
174. Vander Heiden MG, Thompson CB. 1999. Bcl-2 proteins: Inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondria homeostasis?. *Nature Cell Biol.* 1:E209-E216
175. Known J, Choi HL, Huang Y, Chan FL. 1999. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. *Cell Tissue Res.* 298:123-136
176. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. 1999. Mitochondria and cell death – Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* 264:687-701
177. Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 391:496-499
178. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4997-5002
179. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. 1998. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol.* 143:217-224

180. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. 1998. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 273:7770-7775
181. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, Marcineviciute A. 1999. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 274:31734-31739
182. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 274:2225-2233
183. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14681-14686
184. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 139:1281-1292
185. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3668-3672
186. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17:3878-3885
187. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 144:891-901
188. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20:929-935
189. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.* 143:207-215
190. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74:609-619
191. Brustugun OT, Fladmark KE, Doskeland SO, Orrenius S, Zhivotovsky B. 1998. Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ.* 5:660-668
192. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2:156-162
193. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* 91:627-637
194. Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341:233-249
195. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281:2027-2031

196. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. 18:44-51
197. Kroemer G, Reed JC. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 6:513-519.
198. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. 187:1261-1271
199. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. 1999. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell*. 3:159-167
200. Basañez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y, Zimmerberg J, Youle RJ. 1999. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5492-5497
201. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399:483-487
202. Mayer B, Hemmens B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 22:477-481
203. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*. 12:64-76
204. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol*. 15:323-350
205. Michel T, Feron O. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *J Clin Invest*. 100:2146-2152
206. Griffith OW, Kilbourn RG. 1996. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol*. 268:375-392
207. Nathan CF. 1992. Nitric oxide as secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 6:3051-3064
208. Andrade J, Conde M, Sobrino F, Bedoya FJ. 1993. Activation of peritoneal macrophages during prediabetic phase in low-dose streptozotocin-treated mice. *FEBS Lett*. 327:32-34
209. Moilanen E, Vapaatalo H. 1998. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med*. 27:359-367
210. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fessler R, Hofmann F. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 17:3045-3051
211. Wang X, Robinson PJ. 1997. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem*. 68:443-456
212. Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. 1994. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*. 368:635-639

213. Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. 1994. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7583-7587
214. Word RA, Cornwell TL, 1998. Regulation of cGMP-induced relaxation and cGMP-dependent protein kinase in rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol* 274:C748-C756
215. McDonald LJ, Moss J. 1994. Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine. *Mol Cell Biochem.* 138:221-226
216. Stamler JS. 1994. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 78:931-936
217. Brüne B, Dimmeler S, Molina y Vedia L, Lapetina EG. 1994. Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci.* 54:61-70
218. Hobbs AJ. 1997. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.* 18:484-491
219. Callsen D, Pfeilschifter J, Brüne B. 1998. Rapid and delayed p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation by nitric oxide: the role of cyclic GMP and tyrosine phosphatase inhibition. *J Immunol.* 161:4852-4858
220. Callsen D, Brüne B. 1999. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry.* 38:2279-2286
221. Browning DD, Windes ND, Ye RD. 1999. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by lipopolysaccharide in human neutrophils requires nitric oxide-dependent cGMP accumulation. *J Biol Chem.* 274:537-542
222. Kanterewicz BI, Knapp LT, Klann E. 1998. Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus. *J Neurochem.* 70:1009-1016
223. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. 1998. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem.* 273:4220-4226
224. Sciorati C, Nistico G, Meldolesi J, Clementi E. 1997. Nitric oxide effects on cell growth: GMP-dependent stimulation of the AP-1 transcription complex and cyclic GMP-independent slowing of cell cycling. *Br J Pharmacol.* 122:687-697
225. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM. 1996. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem.* 271:19705-19709
226. Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, Plevin R. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* 9:403-410
227. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9:180-186
228. Ahn NG, Seger R, Krebs EG. 1992. The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol.* 4:992-999

229. Hood J, Granger HJ. 1998. Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:23504-23508
230. Suhasini M, Li H, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. 1998. Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 18:6983-6994
231. Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H. 1999. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448:301-303
232. Lo YYC, Wong JMS, Cruz TF. 1996. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* 271:15703-15707
233. Browning DD, McShane MP, Marty C, Ye RD. 2000. Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275:2811-2816
234. Hirakawa Y, Gericke M, Cohen RA, Bolotina VM. 1999. Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in mouse and rabbit aortic smooth muscle cells: regulation by intracellular Ca²⁺ and NO. *Am J Physiol.* 277:H1732-H1744
235. Koh SD, Campbell JD, Carl A, Sanders KM. 1995. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol.* 489:735-743
236. Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. 1994. Stimulation of vascular Na⁺-K⁺-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol.* 266:H2146-H2151
237. Sato T, Kamata Y, Irifune M, Nishikawa T. 1997. Inhibitory effect of several nitric oxide-generating compounds on purified Na⁺,K⁺-ATPase activity from porcine cerebral cortex. *J Neurochem.* 68:1312-1318
238. Drews G, Kramer C, Krippeit-Drews P. 2000. Dual effect of NO on K⁺(ATP) current of mouse pancreatic B-cells: stimulation by deenergizing mitochondria and inhibition by direct interaction with the channel. *Biochim Biophys Acta.* 1464:62-68
239. Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G. 2000. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell.* 102:499-509
240. Nishikawa M, Sato EF, Utsumi K, Inoue M. 1996. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. *Cancer Res.* 56:4535-4540
241. Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. 1994. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun.* 200:1105-1110
242. Peng HB, Libby P, Liao JK. 1995. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 270:14214-14219
243. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. 1996. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* 24:2236-2242

244. Tabuchi A, Oh E, Taoka A, Sakurai H, Tsuchiya T, Tsuda M. 1996. Rapid attenuation of AP-1 transcriptional factors associated with nitric oxide (NO)-mediated neuronal cell death. *J Biol Chem.* 271:31061-31067
245. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3030-3034
246. Sugiura Y, Matsumoto T. 1995. Nucleotide-selective cleavage of duplex DNA by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 211:748-753
247. Wilson GL, Patton NJ, LeDoux SP. 1997. Mitochondrial DNA in beta-cells is a sensitive target for damage by nitric oxide. *Diabetes.* 46:1291-1295
248. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 351:261-272
249. Xie K, Huang S, Dong Z, Fidler IJ. 1993. Cytokine-induced apoptosis in transformed murine fibroblast involves sintesis of endogenous nitric oxide. *Int. J. Oncol.* 3:1043-1048
250. Messmer UK, Lapetina EG, Brune B. 1995. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol Pharmacol.* 47:757-765
251. Hortelano S, Lopez-Collazo E, Bosca L. 1999. Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *Br J Pharmacol.* 126:1139-1146
252. Ankarcona M, Dypbukt JM, Brune B, Nicotera P. 1994. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Exp Cell Res.* 213:172-177
253. Loweth AC, Williams GT, Scarpello JH, Morgan NG. 1997. Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Lett.* 400:285-288
254. Kaneto H, Fujii J, Seo HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T, Taniguchi N. 1995. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 44:733-738
255. Eizirik DL, Delaney CA, Green MH, Cunningham JM, Thorpe JR, Pipeleers DG, Hellerstrom C, Green IC. 1996. Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 118:71-83
256. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC. 1994. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia.* 37:733-738
257. Sandau K, Brune B. 1996. The dual role of S-nitrosoglutathione (GSNO) during thymocyte apoptosis. *Cell Signal.* 8:173-177
258. Fehsel K, Kroncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V. 1995. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol.* 155:2858-2865
259. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 146:75-85

260. Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B. 1997. The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *J Immunol.* 158:4938-4946
261. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS. 1998. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci.* 18:923-931
262. Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U, Klockgether T. 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *J Neurochem.* 71:88-94
263. Kitajima I, Kawahara K, Nakajima T, Soejima Y, Matsuyama T, Maruyama I. 1994. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine mastocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 204:244-251
264. Lopez-Collazo E, Mateo J, Miras-Portugal MT, Bosca L. 1997. Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 413:124-128
265. Nishio E, Watanabe Y. 1997. Nitric oxide donor-induced apoptosis in smooth muscle cells is modulated by protein kinase C and protein kinase A. *Eur J Pharmacol.* 339:245-251
266. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon- γ and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 268:1908-1913
267. Oren M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 274:36031-36034
268. Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brune B. 1994. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355:23-26
269. Brockhaus F, Brune B. 1999. p53 accumulation in apoptotic macrophages is an energy demanding process that precedes cytochrome c release in response to nitric oxide. *Oncogene.* 18:6403-6410
270. Messmer UK, Reimer DM, Reed JC, Brune B. 1996. Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.* 384:162-166
271. Leist M, Volbracht C, Kuhnle S, Fava E, Ferrando-May E, Nicotera P. 1997. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol Med.* 3:750-764
272. Yabuki M, Tsutsui K, Horton AA, Yoshioka T, Utsumi K. 2000. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radic Res.* 32:507-514
273. Hortelano S, Alvarez AM, Bosca L. 1999. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* 13:2311-2317

274. Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Bosca L, Kroemer G. 1997. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 410:373-377
275. Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, Anderson PG. 2000. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 275:20474-20479
276. Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G. 1997. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.* 246:710-718
277. Lopez-Figueroa MO, Caamano C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ. 2000. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 272:129-133
278. Ghafourifar P, Richter C. 1999. Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem.* 380:1025-1028
279. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem.* 274:31185-31188
280. Borutaite V, Morkuniene R, Brown GC. 2000. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Letters* 467:155-159
281. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AHV. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345:50-54
282. Brown GC, Foxwell N, Moncada S. 1998. Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Lett.* 439:321-324
283. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7631-7636
284. Brockhaus F, Brune B. 1998. U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. *Exp Cell Res.* 238:33-41
285. Messmer UK, Reed UK, Brune B. 1996. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 271:20192-20197
286. Melkova Z, Lee SB, Rodriguez D, Esteban M. 1997. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Lett.* 403:273-278
287. Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B. 1997. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int.* 52:378-386
288. Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80:293-299
289. Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera P. 1999. Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent steps upstream and

- downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 258:215-221
290. Lievremont JP, Sciorati C, Morandi E, Paolucci C, Bunone G, Della Valle G, Meldolesi J, Clementi E. 1999. The p75^{NTR}-induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 274:15466-15472
 291. Ceneviva GD, Tzeng E, Hoyt DG, Yee E, Gallagher A, Engelhardt JF, Kim YM, Billiar TR, Watkins SA, Pitt BR. 1999. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 275:L717-L728
 292. Sciorati C, Rovere P, Ferrarini M, Heltai S, Manfredi AA, Clemente E. 1997. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gd T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272:23211-23215
 293. Liu L, Stamler JS. 1999. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Deth Differentiation* 6:937-942
 294. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272:31138-31148
 295. Saavedra JE, Billiar TR, Williams DL, Kim YM, Watkins SC, Keefer LK. 1997. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver. *J Med Chem.* 40:1947-1954
 296. Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. 1995. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest.* 95:1884-1890
 297. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. 1997. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 185:601-607
 298. Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS. 1998. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 18:3708-3714
 299. Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han JA, Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR. 1999. Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J Neurosci.* 19:6740-6747
 300. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. 1994. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell.* 79:1137-1146
 301. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P. 1995. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest.* 96:2247-2259
 302. Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ. 1995. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology.* 136:3120-3127

303. Beauvais F, Michel L, Dubertret L. 1995. The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett.* 361:229-232
304. Tennesi L, D'Emilia DM, Lipton SA. 1997. Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett.* 236:139-142
305. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S. 1999. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem.* 274:6823-6826
306. Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. 1998. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett.* 433:125-131
307. Mallozzi C, Di Stasi AM, Minetti M. 1999. Activation of src tyrosine kinases by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 456:201-206
308. Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Hamaguchi M, Nakashima I. 1999. Nitric Oxide controls Src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J. Biol. Chem.* 274:25821-25826
309. LaFevre-Bernt M, Corbin JD, Francis SH, Miller WT. 1998. Phosphorylation and activation of cGMP-dependent protein kinase by Src. *Biochim. Biophys. Acta.* 1386:97-105
310. Suschek CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V. 1999. Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 Up-regulation. *J. Biol. Chem.* 274:6130-6137
311. Sandau KB, Brüne B. 2000. Up-regulation of Bcl-2 by redox signal in glomerular mesangial cells. *Cell Death Differ.* 7:118-125
312. Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. 1997. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor α induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 272: 1402-1411
313. Wong HR, Mannix RJ, Rusnak JM, Boota A, Zar H, Watkins SC, Lazo JS, Pitt BR. 1996. The heat shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respr. Cell Mol. Biol.* 15:745-751
314. Thomas SM, Brugge JS. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13:513-609
315. Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ. 1997. Role of cSrc tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Frontier in Bioscience* 2:d501-d518
316. Corey SJ, Anderson SM. 1999. Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 93:1-14
317. Alland L, Peseckis SM, Atherton RE, Berthiaume L, Resh MD. 1994. Dual myristylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization. *J Biol Chem.* 269:16701-5.
318. Schwartzberg PL. 1998. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 17:1463-1468

319. Xu W, Harrison SC, Eck MJ. 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602
320. Moarefi I, LaFevre-Bernt M, Sicheri F, Huse M, Lee CH, Kuriyan J, Miller WT. 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature*. 385:650-653
321. Levy JB, Iba H, Hanafusa H. 1986. Activation of the transforming potential of p60c-src by a single amino acid change. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:4228-4232
322. Cheng HC, Bjorge JD, Aebersold R, Fujita DJ, Wang JH. 1996. Purification of bovine thymus cytosolic C-terminal Src kinase (CSK) and demonstration of differential efficiencies of phosphorylation and inactivation of p56lyn and pp60c-src by CSK. *Biochemistry*. 35:11874-11887
323. Piwnica-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, Smith AE, Cheng SH. 1987. Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell*. 49:75-82.
324. Cooper JA, King CS. 1986. Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol Cell Biol*. 6:4467-4477
325. Karni R, Jove R, Levitzki A. 1999. Inhibition of pp60^{c-Src} reduces Bcl-X_L expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 18:4654-4662
326. Chaturvedi P, Ramana Reddy MV, Prekumar Reddy E. 1998. Src kinase and not JAKs activate STATs during IL-3 induced myeloid cell proliferation. *Oncogene* 16:1749-1758
327. Ricci JE, Maulon L, Luciano F, Guerin S, Livolsi A, Mari B, Breitmayer JP, Peyron JF, Auberger P. 1999. Cleavage and relocation of the tyrosine kinase P59FYN during Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes. *Oncogene* 18:3963-3969
328. Anneren C, Welsh M. 2000. Role of the Bsk/lyk non-receptor tyrosine kinase for the control of growth and hormone production in RINm5F cells. *Growth Factors* 17:233-247
329. Oberg-Welsh C, Anneren C, Welsh M. 1998. Mutation of C-terminal tyrosine residues Y497/y504 of the Src-family member Bsk/lyk decreases NIH3T3 cell proliferation. *Growth Factors* 16:11-124
330. Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M. 1992. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*. 71:1081-1091
331. Abe J-I, Takahashi M, Ishida M, Lee J-D, Berk BC. 1997. c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1). *J. Biol. Chem*. 272: 20389-20394.
332. Yan et al., 1999. shear stresses and Src
333. Chu DM, Corbin JD, Grimes KA, Francis SH. 1997. Activation by cyclic GMP binding causes an apparent conformational change in cGMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem*. 270:31922-31928
334. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. 1997. Distinct and specific functions of cGMP-dependent proteon kinases. *Trends Biochem. Sci*. 22:307-312

335. Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. 1999. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:105-49.
336. Chu DM, Francis SH, Thomas JW, Maksymovitch EA, Fosler M, Corbin JD. 1998. Activation by autophosphorylation or cGMP binding produces a similar apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 273:14649-14656.
337. Smith JA, Francis SH, Walsh KA, Kumar S, Corbin JD. 1996. Autophosphorylation of type Ib cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP. *J Biol Chem.* 271:20756-20762
338. Yu SM, Hung LM, Lin CC. 1997. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation* 95:1269-1277
339. Gazdar AF, WL Chick, HK Oie, HL Sims, DL King, GC Weir y V Lauris). 1980. Continuous, clonal, insulin-and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3519-3523
340. Mittal, CK. 1986. Determination of adenylate cyclase and guanylate cyclase activities in cells of the immune system. *Methods Enzymol.* 132: 422-428.
341. Colbran JL, Francis SH, Leach AB, Thomas MK, Jiang H, McAllister LM, Corbin JD. 1992 A phenylalanine in peptide substrates provides for selectivity between cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 267: 9589-9594
342. Glass DB, Cheng HC, Mende-Muller L, Reed J, Walsh DA. 1989 Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein. *J. Biol. Chem.* 264: 8802-8810.
343. Francis SH., Wolfe L. and Corbin JD. 1991. Purification of type Ia and type Ib isozymes and proteolyzed type Ib monomeric enzyme of cGMP-Dependent Protein Kinase from bovine aorta. *Methods Enzymol.* 200: 332-341
344. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376:37-43
345. Kamps MP. 1991. Generation and use of anti-phosphotyrosine antibodies for immunoblotting. *Methods Enzymol.* 201: 101-110
346. Bauminger S, Wilchek M. 1980. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods Enzymol.* 70: 151-159
347. Carballo M, Vilaplana R, Márquez G, Conde M, Bedoya FJ, González-Vilchez F, Sobrino F. 1997. A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J.* 328: 559-564
348. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, 17: 37-49

349. Kawakatsu H, Sakai T, Takagaki Y, Shinoda Y, Saito M, Owada MK, Yano J. 1996. A new monoclonal antibody which selectively recognizes the active form of Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 271:5680-5685.
350. Feder D, Bishop JM. Purification and enzymatic characterization of pp60^{c-Src} from human platelets. *J. Biol. Chem.*;265:8205-11, 1990
351. Soff GA, Cornwell TL, Cundiff DL, Gately S, Lincoln TM. 1997. Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP, and cyclic AMP. *J. Clin. Invest.* 100:2580-2587
352. Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. 1997. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 100: 942-948.
353. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271: 2185-2192
354. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. 1997. Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes.* 46:750-7
355. Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD. 1997. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:213-218
356. Augstein P, Stephens LA, Allison J, Elefanty AG, Ekberg M, Kay TW, Harrison LC. 1998. Beta-cell apoptosis in an accelerated model of autoimmune diabetes. *Mol Med.* 4:495-501
357. Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen LD, Molvig J, Pociot F, Johannesen J, Nerup J. 1990. Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 164:169-193
358. Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, Tomita K, Namba M, Kuwajima M, Noguchi T, Tsujimoto Y, Matsuzawa Y. 1996. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia.* 39:530-536
359. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM, Dimmeler S. 1997. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide.* 1:282-293
360. Cunningham JM, Mabley JG, Delaney CA, Green IC. 1994. The effect of nitric oxide donors on insulin secretion, cyclic GMP and cyclic AMP in rat islets of Langerhans and the insulin-secreting cell lines HIT-T15 and RINm5F. *Mol Cell Endocrinol.* 102:23-29.
361. Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK. 1995. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.* 25:674-678.

Juan Roberto Tejedo Huamán
Papel de la proteínas dependiente de cGMP (PKG)
de la c-Src tirosina quinasa en la regulación autofónica
del óxido nítrico sobre la apoptosis
honorablemente "cum laude"

por unanimidad

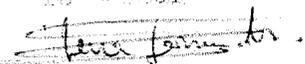
15

Diciembre

2000

El Presidente


El Secretario


El Vocal


El Presidente

El Secretario

El Doctorado

