

## PREMIO NOBEL DE FISIOLÓGÍA Y MEDICINA 2002 APOPTOSIS\*

MARÍA CASCALES ANGOSTO

El 10 de Diciembre de 2002, la Academia Sueca concedió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina a **Sydney Brenner**, **John Sulston** y **Robert Horwitz** por «sus descubrimientos sobre los mecanismos genéticos que controlan el perfecto equilibrio entre la generación de tejidos y los procesos de muerte celular programada (apoptosis). Este complejo ciclo de vida y muerte está en la base misma de la supervivencia del ser humano».

**Sydney Brenner**, nacido en Sudáfrica en 1927 y nacionalizado en EEUU, es Presidente del Instituto de Ciencias Moleculares en Berkeley. Muy joven trabajó con Francis Crick, uno de los descubridores de la estructura del DNA, y ha determinado la existencia de la molécula del RNA mensajero en la síntesis de proteínas. El área que le ha conducido al Nobel supuso un viraje en su carrera investigadora en los años 1960. En este momento inició sus investigaciones en el *Caenorhabditis elegans* convirtiéndolo en un valioso modelo experimental para el análisis de los procesos biológicos. En 1986 publicó un mapa completo del sistema nervioso del *C. elegans* y últimamente ha identificado y caracterizado una serie de genes implicados en la neurobiología funcional del nematodo.

**John Sulston**, nacido en el Reino Unido en 1942, ha sido responsable del único centro europeo involucrado directamente en el proyecto Genoma Humano, «Sanger Center». Su participación en este Centro estaba avalada por su amplia experiencia en la secuenciación del genoma del *Caenorhabditis elegans*. Sir Sulston recibió el Premio Príncipe de Asturias en el 2001. El pasado año estuvo en España presentando su libro «El hilo común. Una Historia de Ciencia, Política y Genoma Humano» en el que defiende el uso público de los datos del genoma. Sir John Sulston amplió el trabajo de Brenner con el *C. elegans* y desarrolló técnicas para estudiar las divisiones celulares en el nematodo, desde el huevo fertilizado hasta el adulto. Este investigador ha demostrado que cada nematodo adulto posee exactamente 959 células y el mismo programa de división y diferenciación. Como resultado de estos hallazgos puso de manifiesto que las células específicas siempre mueren mediante un programa. Describió las primeras etapas de la muerte celular y demostró las primeras mutaciones de genes que participan en la muerte celular programada, incluyendo el gen que codifica una nucleasa que degrada el DNA en células moribundas

---

\* Conferencia pronunciada en la Real Academia de Doctores de España el 29 de enero de 2003.

**Robert Horvitz**, nacido en EEUU en 1947, es catedrático de biología e investigador del Instituto de Tecnología de Massachussets. El y su equipo han descubierto, en el *Caenorhabditis elegans*, 15 genes con un papel clave en la muerte celular programada, apoptosis. Sus hallazgos en el gusano se han confirmado después en el ser humano y han dado lugar al descubrimiento de una vía genética para la muerte celular programada, proceso biológico activo y natural de la misma categoría que la división y diferenciación celular, que existe en todos los organismos y que se encuentra implicada en numerosas enfermedades. En 1986 descubrió los primeros «genes de muerte», *ced-3* y *ced-4*. El *ced-3* codifica una caspasa y la acción del *ced-3* está facilitada por *ced-4*. También demostró que otro gen, el *ced-9*, protegía frente a la apoptosis bloqueando *ced-4* y *ced-3*. Los otros genes descubiertos por este investigador se refieren a sistemas de transducción de señales y a genes que intervienen en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. El descubrimiento de la homología entre los genes del *C. elegans* y los humanos, ha de permitir comprender enfermedades humanas basadas en un mal funcionamiento de los procesos que conllevan a la división y muerte celulares.

El conocimiento de los procesos que conducen a la muerte celular programada está siendo muy útil para comprender los mecanismos mediante los cuales algunos virus y bacterias invaden nuestras células. En enfermedades degenerativas, sida, infarto cerebral y miocárdico, la pérdida celular se debe a una excesiva apoptosis. Otras enfermedades, tales como el cáncer, se caracterizan por una disminución de apoptosis, lo cual conlleva a la supervivencia inadecuada de células destinadas a morir. Muchas estrategias terapéuticas pueden tener su base en la activación o en la inhibición de la apoptosis. A partir de ahora será posible manipular estas vías para que células no deseadas sean eliminadas del organismo.

Los tres investigadores premiados han utilizado para sus investigaciones un nematodo hermafrodita, el *Caenorhabditis elegans*, gusano que se ha convertido en un modelo biológico para el estudio de los procesos celulares y genéticos que se producen en la transición desde el estado embrionario hasta el adulto. Es tal el interés que despierta este nematodo por el hecho de que los tres investigadores premiados tengan en común sus investigaciones sobre este modelo, que algunos se han atrevido a proponer que el verdadero Premio Nobel lo ha recibido el *Caenorhabditis elegans*.

## ¿POR QUÉ EL *CAENORHABDITIS ELEGANS*?

Son varios cientos de científicos los que se encuentran en la actualidad investigando sobre la biología del *C. elegans*. Un consorcio internacional de laboratorios colabora en un proyecto que ha secuenciado los más de 100 millones de pares de bases del genoma de este nematodo. ¿Por qué invertir tanto esfuerzo en un organismo tan insignificante?

Este organismo, a pesar de su simplicidad, desarrolla los mismos procesos que un organismo superior: embriogénesis, desarrollo, funcionamiento del sistema nervioso, comportamiento y envejecimiento. El *C. elegans* representa el compromiso perfecto entre la facilidad de su manejo y la complejidad de las funciones regidas por genes, que se han conservado a lo largo de la evolución desde los gusanos hasta los mamíferos.

Aunque el *C. elegans* es un organismo de los más primitivos, comparte muchas de las características esenciales de la biología humana. Posee un sistema nervioso con un «cerebro» (nervio circunfaringeo). Muestra comportamiento y es incluso capaz de un rudimentario aprendizaje. Es hermafrodita, produce espermatozoides y huevos, y se reproduce por autofertilización. Cuando los alelos se vuelven homocigóticos tiene que recurrir al apareamiento del que surgen un 50% de hermafroditas y un 50% de machos. En cultivo en el laboratorio, los machos están en muy pequeña proporción (0,5%). Después de la reproducción el gusano envejece, pierde vigor y muere. En este insignificante nematodo se incluye la mayoría de los misterios fundamentales de la biología moderna. Su tamaño es de 1 mm de largo, se manipula fácilmente en placas petri y se alimenta de bacterias. En estado adulto posee 959 células somáticas. Su cuerpo es transparente, por lo que sus células pueden visualizarse fácilmente al microscopio óptico en el nematodo vivo. Su promedio vital es de 2 a 3 semanas.

El ciclo de vida del *C. elegans* se compone de dos fases principales: desarrollo embrionario y post embrionario. 14 horas después de la fertilización, el huevo se abre y procede el desarrollo con cuatro estados larvares separados por mudas. En la transición al estado adulto ha de perder por apoptosis 131 células

En Noviembre de 2002 se consiguió la secuenciación completa del genoma del *C. elegans*. Las 100.258.171 pares de bases se encuentran presentes en seis segmentos contiguos que corresponden a seis cromosomas nucleares. Cinco de ellos autosómicos y el sexto es XX en el hermafrodita y XO en el macho. Este impresionante trabajo ha sido realizado por el consorcio secuenciador del genoma del *C. elegans* en el Wellcome Trust Sanger Institute y en el Centro Secuenciador del Genoma de la Universidad de Washington

En 1982 tuvo lugar un descubrimiento que abrió las puertas al estudio profundo de las bases moleculares y genéticas del proceso de apoptosis. Horvitz publicó los estudios genéticos realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* en los que se describieron los genes encargados del control y la ejecución de la apoptosis. Gracias

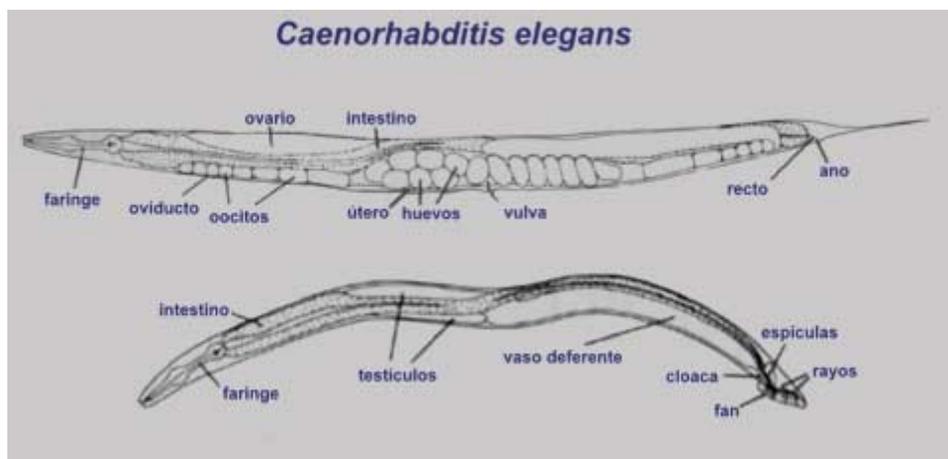


FIGURA 1. El nematodo *Caenorhabditis elegans*. En la parte superior el gusano hermafrodita y en la parte inferior el macho.

a la homología existente entre los genes del nematodo y los de los organismos superiores, la apoptosis en el *C. elegans* ha sido tomada como referencia de este proceso en todos los sistemas y esto ha permitido identificar una parte importante de la red de mecanismos que lo controlan. Los genes que intervienen en la apoptosis muestran un grado elevado de conservación, desde los nematodos a los vertebrados, lo que sugiere que este proceso debió surgir cuando aparecieron los organismos pluricelulares.

En el *Caenorhabditis elegans*, se han identificado un número de genes de muerte celular: *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*. CED-3, el producto del gen *ced-3*, se requiere para la muerte celular programada y es homólogo del ICE (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme) de mamíferos. Esto ha llevado al descubrimiento de una gran familia de proteasas similares a ICE que se han redenominado caspasas (cisteinil proteasas específicas de aspartato). Los correspondientes productos de los genes *ced-4* y *ced-9* en mamíferos son el factor Apaf-1 (factor 1 activador de las proteasas) y la familia de las proteínas Bcl-2, respectivamente. EGL1, es la proteína codificada por el gen *egl-1*, el primer gen descubierto del sistema de la muerte celular programada, que supone una mutación de ganancia de función, que causa la muerte no programada de dos neuronas que inervan la vulva, produciendo un defecto en la puesta de huevos (egg laying defective) (Figura 2).

## APOPTOSIS. INTRODUCCIÓN

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso celular fundamental y esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma de muerte celular se realiza mediante la activación de un programa intrínseco y

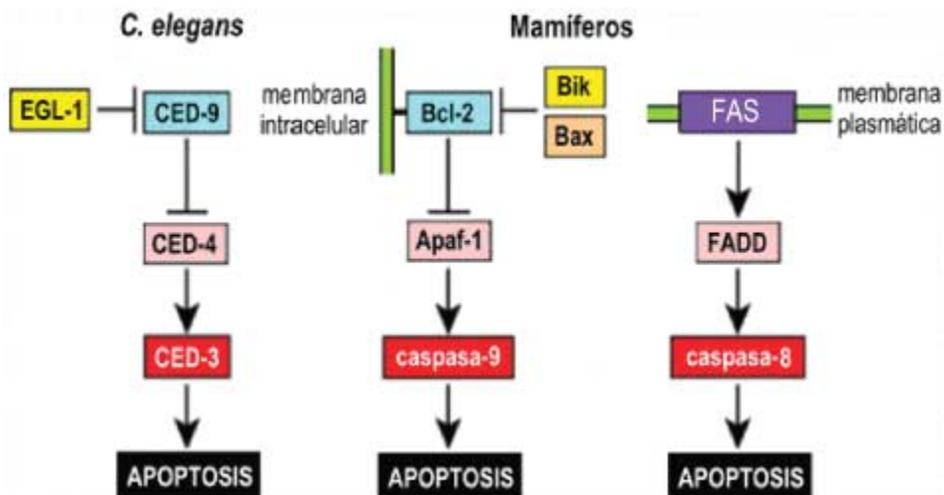


FIGURA 2. *CED-3* y *CED-4* se requieren para la apoptosis y *CED-9* actúa previniendo la activación de *CED-3* y *CED-4* en el nematodo. Los productos correspondientes a *CED-3* y *CED-9* en mamíferos son la caspasa y la BCL-2, respectivamente. La identificación de un factor activador de las proteínas apoptóticas Apaf-1 como el homólogo en mamíferos de *CED-4* ha sido definitiva para demostrar la conservación evolutiva del programa de muerte celular.

se caracteriza por mantener intactas las membranas celulares, permitiendo así su eliminación por fagocitosis. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye una serie de fenómenos: condensación citoplasmática y nuclear, rotura específica de proteínas celulares, fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares. En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción. Estos hechos demuestran que la muerte celular programada o apoptosis está mediada por mecanismos celulares intrínsecos.

La serie de acontecimientos que se verifican en la apoptosis se encuentran genéticamente programados en la célula y suponen una cascada de cambios morfológicos y bioquímicos, dependientes de energía, que conducen a su muerte y eliminación

En la ejecución de la apoptosis pueden distinguirse cuatro fases: decisión si una célula ha de morir; muerte; fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos y degradación de los cuerpos fagocitados.

## NECROSIS Y APOPTOSIS

A nivel celular existen dos formas de morir: necrosis o apoptosis. Por necrosis las células mueren accidentalmente cuando se lesionan por agresión mecánica o tóxica. Por apoptosis las células mueren cuando son inducidas a suicidarse

En la necrosis se detectan una serie de cambios característicos (Figura 3):

- las células y sus orgánulos se hinchan, porque se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de iones y agua;
- las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular;
- se origina inflamación de los tejidos adyacentes.

La apoptosis o suicidio celular presenta las características siguientes (Figura 3):

- las células reducen su tamaño,
- sus mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo c;
- en la superficie celular aparecen una especie de vejigas;
- en el núcleo se degrada la cromatina (DNA y proteínas);
- las células se rompen en fragmentos rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos;

- la fosfatidil serina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en la superficie;
- la fosfatidil serina se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos;
- las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación

En la apoptosis, los acontecimientos suceden de manera tan ordenada, que este suicidio celular se denomina muerte celular programada. En él pueden diferenciarse varias fases:

**Fase efectora**, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el  $Ca^{++}$  intracelular, que origina la activación de ciertos enzimas (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto que producen alteraciones en el tamaño y forma celular.

**Fase degradativa**, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, lo que impide la salida del contenido celular y la inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen marcados cambios en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

**Fase de eliminación**, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos, la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas.

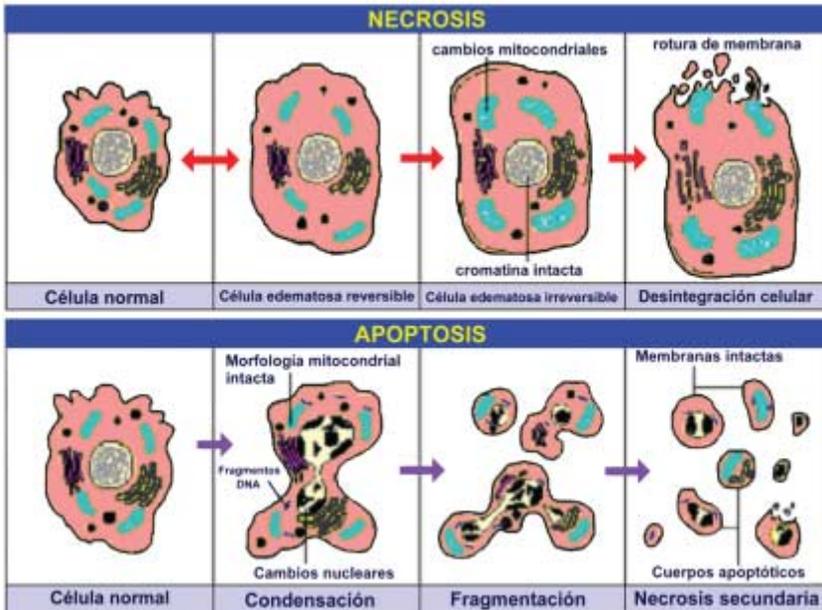


FIGURA 3. Diferencia entre necrosis y apoptosis.

Existen dos razones que justifican que las células mueran por apoptosis: la eliminación de células en exceso y la eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo

Ejemplos de eliminación de células en exceso:

- la reabsorción de la cola de los renacuajos,
- la eliminación de las membranas interdigitales en la formación de los dedos en el feto,
- la pérdida por apoptosis de 131 células para alcanzar el *C. elegans* el estado adulto
- la eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación,
- la formación de las sinapsis entre neuronas en cerebro requiere que se eliminen por apoptosis una serie de células.

Ejemplos de eliminación de células que representan un peligro para el organismo

- *Las células infectadas con virus.* Son destruidas por los linfocitos T citotóxicos.
- *Las células del sistema inmune.* Después de la respuesta inmune, las células efectoras han de ser eliminadas para prevenir que ataquen a los constituyentes propios del organismo. Los linfocitos T citotóxicos inducen la apoptosis en cada una de las distintas células del sistema inmune e incluso en ellas mismas. Cualquier defecto en la maquinaria apoptótica de estas células inmunes, se encuentra asociado con enfermedades autoinmunes tales como el *lupus eritematosus* o la artritis reumatoide.
- *Las células con el DNA lesionado.* La lesión en su genoma hace que las células puedan llegar a desarrollar cáncer. Las células responden a la lesión al DNA incrementando la producción de p53, un poderoso inductor de la apoptosis. Las mutaciones en p53 producen una proteína defectiva que a menudo se detecta en células cancerosas.
- *Las células cancerosas.* La radioterapia y la quimioterapia inducen la apoptosis en algunos tipos de cáncer.
- *Las células que han sufrido agresión tóxica.* (Figura 4)

## INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS

Para que una célula sea inducida a la apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales de supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales de supervivencia se encuentran los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células

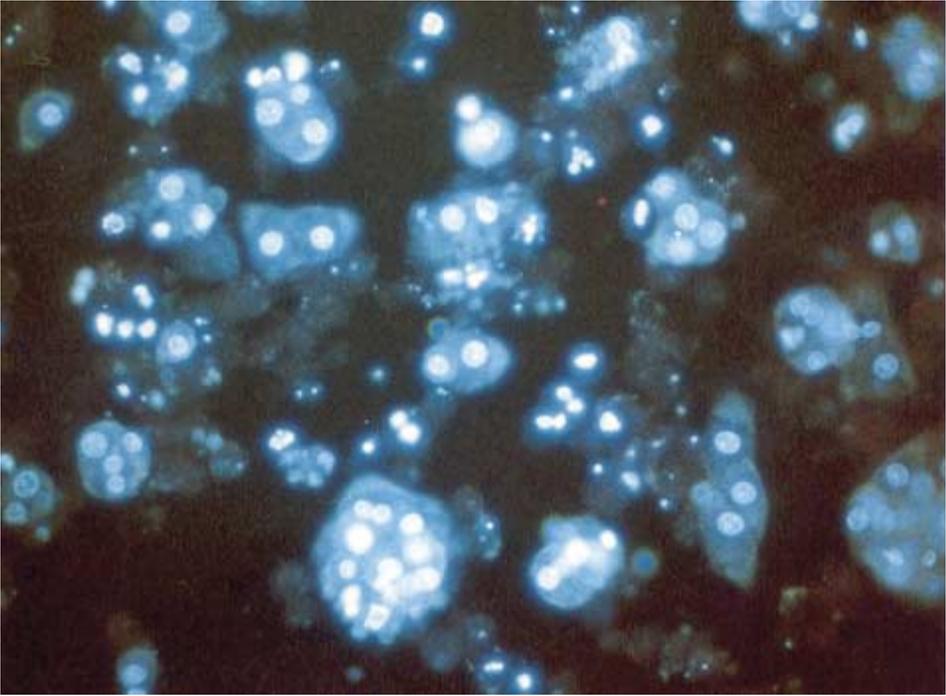


FIGURA 4. *Hepatocitos en cultivo incubados en presencia de cocaína 1 mM. Se observa la fragmentación típica de la apoptosis. Hoechst 33258. (Zaragoza et al 2000).*

hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende de la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de colonias), y la eliminación de ellos no conduce a la parada del crecimiento, sino que conduce irremediablemente a la apoptosis.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del DNA, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos; moléculas que se unen a receptores de membrana específicos y transmiten señales que desencadenan el programa apoptótico, etc. Entre los activadores de muerte se encuentran el  $\text{TNF}\alpha$ , que se une al receptor TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas o CD95, etc.

En la apoptosis intervienen dos clases de proteasas: las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas, verdaderas guillotinas moleculares, son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis. Las caspasas iniciadoras se activan por autoproteólisis después de un estímulo apoptótico. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las características siguientes:

1. son cisteína proteasas específicas de aspartato. Tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de sus sustratos que los rompen en los enlaces D-X;

2. son sintetizadas como procasasas y adquieren su actividad por proteolisis;
3. efectúan la proteolisis en sustratos específicos, proceso que es irreversible;
4. las caspasas y sus inhibidores coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Las procasasas (30-50kD) contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad larga (p20) y una subunidad corta (p10). Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14; el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9, -10; y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes (-3, -7).

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto para la 14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procasasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en la activación de las procasasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas.

Se conoce la estructura tridimensional de las caspasas -1, -3, y -8: se componen de dos heterodímeros (p10 -p20) que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con las dos subunidades cortas adyacentes rodeadas por las dos subunidades largas. Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis (Figura 5).

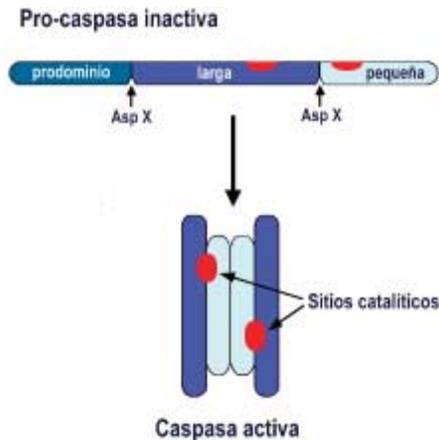


FIGURA 5. La procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad larga y una subunidad corta. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad larga y la corta se unen para formar un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes.

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las misiones siguientes:

- cortar contactos con células vecinas,
- reorganizar el citoesqueleto,
- activar las endonucleasas (fragmentación del DNA),
- dismantelar las laminas nucleares (condensación),
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina),
- activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el DNA. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente. La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas tales como citocromo c y smac/diablo. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica), para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas. Smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de los miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas multidominios proapoptóticas, de la familia Bcl-2, Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee solo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas, solo BH3, como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de Bax y Bak. La liberación regulada de factores proapoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

La vía extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc), para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas-8 y -10), que a su vez, activan por proteólisis a las ejecutoras o efectoras, las caspasas-3 y -7. Esta vía puede estar regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las iniciadoras y a las ejecutoras.

### **APOPTOSIS DESENCADENADA POR SEÑALES INTERNAS: VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL**

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o la inducida por estrés, se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo c. Los mecanismos de lesión mitocondrial en respuesta a diferentes situaciones de estrés es un tema debatido. Sin embargo, la activación de Bax, mediada por p53, parece que está ganando adeptos, y puede servir como paradigma para explicar la alteración mitocondrial activada por estrés. Bax se ha demostrado que se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad

transitoria (MPTPC), que se forma por el transportador de adenín nucleótido (ANT), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (VACN) y la ciclofilina D. El poro MPTPC participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de la membrana ( $\Delta\Psi_m$ ), y el volumen mitocondrial y funciona como un canal aniónico. Se ha demostrado que la proteína proapoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT que se localiza en la membrana interna mitocondrial. La apertura del poro trae consigo un descenso en  $\Delta\Psi_m$  y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluye:

1. el citocromo c, que desencadena la activación de las caspasas,
2. el smac/diablo, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP),
3. el factor inductor de la apoptosis (AIF) que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas.

La incorporación del citocromo c al citosol desencadena la apoptosis vía caspasa-9 y Apaf-1. Sin embargo, se han descrito varios modelos alternativos para explicar la apoptosis mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que la salida del citocromo c puede ocurrir en momentos previos a la apertura del poro de permeabilidad transitoria y a la pérdida del potencial de membrana, y que Bax puede promover esta salida sin implicar al poro.

En una célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en su superficie. Bcl-2 se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas). De esta manera Apaf-1 se mantiene en forma inactiva. Cualquier alteración del equilibrio interno de la célula, por ejemplo elevación de las especies reactivas de oxígeno, causa la salida del citocromo c. A su vez Bcl-2 deja libre a Apaf-1 que se une al citocromo c

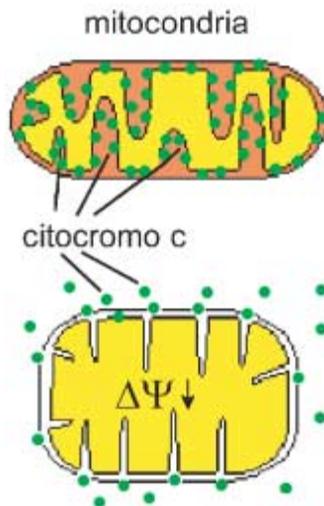


FIGURA 6. Salida del citocromo c de la mitocondria por apertura del poro de permeabilidad transitoria.

Dentro de la mitocondria, inserto en la cadena de transporte electrónico, el citocromo c funciona en un proceso que genera la energía necesaria para la vida de la célula. Sin embargo, fuera de la mitocondria en el citosol el mismo citocromo c es un activador de muerte. El objetivo citosólico del citocromo c es el homólogo del CED-4, el Apaf-1 (Figura 7).

El citocromo c en el citosol se une al terminal C del Apaf-1 en la región que contiene múltiples motivos WD-40. Esta unión facilita la inserción de dATP a la molécula Apaf, la molécula se abre y expone la superficie de oligomerización. Apaf-1 oligomeriza lo cual va acompañado por un reclutamiento simultáneo de procaspasa-9 al motivo CARD del terminal N de Apaf-1. Parece ser que la activación de la caspasa-9 dentro del complejo apoptosoma se consigue mediante proteólisis autocatalítica.

Estudios de filtración sobre gel revelan que el Apaf-1 se incorpora a un complejo de elevado peso molecular después de activarse mediante la adición del citocromo c y dATP a su molécula. El Apaf-1 monomérico tiene un peso molecular de 130 kD. No está aún claro el número de monómeros Apaf-1 que oligomeriza. En la figura se muestra un heptámero. Se sabe que la relación entre las moléculas de procaspasa-9 y Apaf-1 es de 1:1, pero se desconoce la relación entre el Apaf-1 y el citocromo c.

Se sugiere que Apaf-1 es un regulador alostérico de la caspasa-9, ya que uno y otra funcionan como subunidades de un holoenzima, el apoptosoma, en el que la capacidad

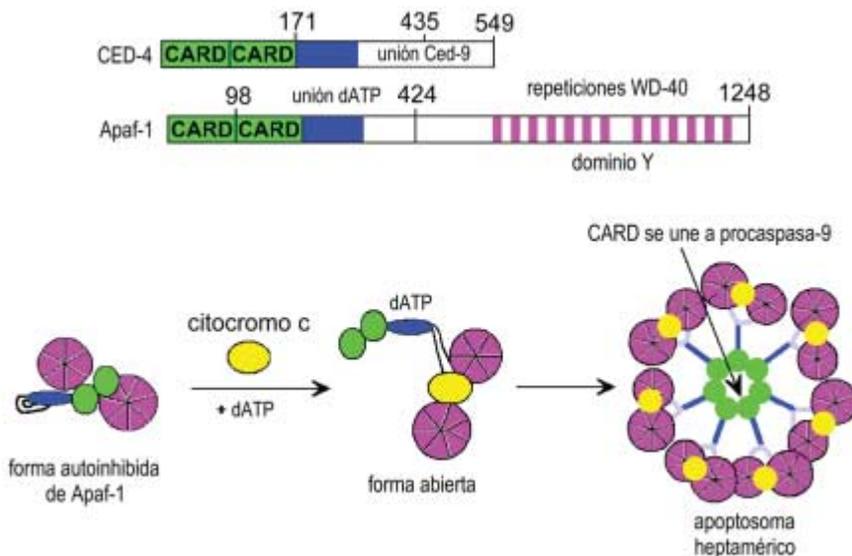


FIGURA 7. Formación del apoptosoma. El Apaf-1, factor activador de proteasas apoptóticas, posee tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión a dATP y dominio Y de repeticiones WD-40. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo c sale de la mitocondria. Al unirse citocromo c y dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma. En esta figura son siete moléculas de Apaf-1 que se han unido dejando la zona CARD en el centro que es donde va a unirse el prodominio N-terminal de las procaspasas-9.

de las moléculas de Apaf-1 limita la actividad proteolítica de la caspasa-9. La procaspasa-9 sufre una autoproteólisis, se vuelve activa y activa, a su vez, a otras caspasas. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica, que conlleva la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del DNA cromosómico y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

### **APOPTOSIS DESENCADENADA POR SEÑALES EXTERNAS: VÍA EXTRÍNSECA MEDIADA POR RECEPTOR**

Después de la activación de un receptor de los denominados de muerte, la proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activa, desencadena su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora). Sin embargo, paralelamente, la caspasa-8 puede activar la vía apoptótica intrínseca al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria y activar la caspasa-9. Al igual que la caspasa-8, la caspasa-9 iniciadora activa a las caspasas ejecutoras.

Los receptores de muerte más conocidos son el Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula (Figura 8). La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula.

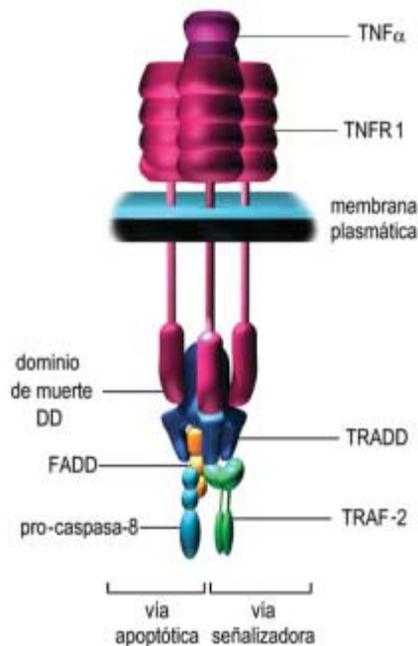


FIGURA 8. Señalización de la apoptosis por el receptor TNFR1.

Son estos, por tanto, receptores de la superficie celular que transmiten las señales apoptóticas que se inician por unión del ligando específico. Estos receptores juegan un papel importante en la apoptosis ya que pueden activar la cascada de caspasas en pocos segundos después de la unión de ligando y receptor. Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF) poseen generalmente otras funciones además de la de ser apoptogénicos. Los mejores caracterizados son el FAS o CD95, el TNFR-1 y los TRAIL DR4 y DR5

El factor TNF se produce por las células T y por los macrófagos activos en respuesta a la infección. La unión del TNF al TNFR1 ejerce diversos efectos (Figura 8). El efecto señalizador conduce a la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1 lo que conlleva a la inducción de una serie de genes proinflamatorios e inmunomoduladores. En algunas células, sin embargo, el TNF puede inducir la apoptosis.

La unión de TNFα a su receptor TNFR1 origina la trimerización del receptor y el agrupamiento de dominios de muerte intracelulares. Esto permite la unión de un adaptador intracelular denominado TRADD o dominio de muerte asociado al TNFR, vía interacciones entre los dominios de muerte. El dominio TRADD posee la capacidad de reclutar una serie de proteínas diferentes en el receptor activo. La unión de TRAF2 o factor asociado al TNF origina la activación de la vía NFκB y JNK/Ap1. El dominio TRADD puede también asociarse con FADD y de esta manera se induce la apoptosis mediante el reclutamiento y rotura de la pro-caspasa-8.

Cuando las células T citotóxicas reconocen la célula objetivo (infectada), producen el ligando Fas (FasL) en su superficie. Éste ligando se une al receptor Fas en la superficie de la célula infectada, conduciéndola a la muerte por apoptosis. Las etapas tempranas en la apoptosis son reversibles. En algunos casos, la destrucción final de la célula solo puede ser garantizada después de su fagocitosis (Figura 9).

La señalización por el receptor Fas se verifica en estos tres casos:

- muerte de las células infectadas mediada por células T citotóxicas;
- deleción de células T activas al final de la respuesta inmune y
- destrucción de células inflamatorias e inmunes en sitios inmunes privilegiados.

La activación de la apoptosis a través de la señalización por FasL se verifica de manera similar a la del TNF. El ligando Fas (FasL) es un trímero que en asociación con el receptor Fas promueve su trimerización que, a su vez, origina un agrupamiento intracelular de partes del receptor denominadas dominios de muerte (DD, death domains). Esto permite que una proteína adaptadora FADD (Fas-associated death domain) se asocie con el receptor mediante una interacción entre dominios de muerte homólogos sobre el receptor y sobre FADD. Además de contener un DD, FADD contiene un dominio efector de muerte (DED, death effector domain). Este permite la unión de la procaspasa-8. La pro-caspasa-8 se asocia al DED de FADD y se rompe para producir la caspasa-8 activa.

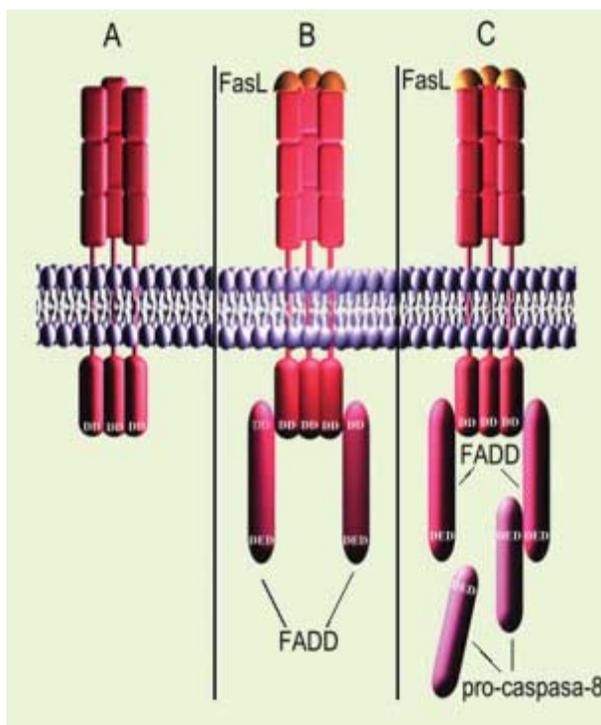


FIGURA 9. Vía utilizada por las células T citotóxicas para inducir la apoptosis en células infectadas.

## FACTOR INDUCTOR DE LA APOPTOSIS (AIF)

Se ha clonado una molécula nueva asociada con la apoptosis denominada factor inductor de la apoptosis (AIF). Al igual que el citocromo c, AIF se localiza en la mitocondria y sale de ella en respuesta a un estímulo de muerte. Se ha demostrado que la inactivación genética de AIF vuelve a las células embrionarias resistentes a la muerte celular inducida por privación de suero (factores de supervivencia). Además, el AIF es esencial para la apoptosis en la morfogénesis del ratón. La muerte celular dependiente del AIF muestra características típicas de la apoptosis y puede ser desacoplada genéticamente de la expresión de Apaf1 y caspasa-9.

El AIF es una proteína que reside normalmente en el espacio intermembranal de la mitocondria. Este factor de 57 kD, posee una secuencia de aminoácidos que presenta homología con la ferredoxina bacteriana y con las NADH-oxidoreductasas. Procede de un propeptido de 67 kD que contiene una secuencia de localización mitocondrial entre sus 120 primeros aminoácidos. El AIF maduro contiene un MLS putativo (secuencia de localización mitocondrial). Cuando la célula recibe una señal o mediante la inducción de la apoptosis con estaurosporina, el AIF sale de la mitocondria, del mismo modo que el citocromo c, y se dirige al núcleo; allí se une al DNA y desencadena la destrucción del DNA y la muerte celular. En núcleos aislados, el AIF recombinante induce la condensación de cromatina y la fragmentación del DNA en fragmentos de 50 kb, pero no induce la rotura oligonucleosómica

## EFECTOS NUCLEARES

La degradación del DNA cromosómico en fragmentos oligonucleosómicos es una de las características de la apoptosis. La fragmentación del DNA en células apoptóticas fue descrita por Willie en 1980. Estímulos apoptóticos como el etopósido, radiaciones UV o gamma, inducen la fragmentación del DNA que puede detectarse por electroforesis de gel de agarosa y observar las repeticiones de 200 kb en forma escalonada, que corresponden a las proteínas de las histonas en los cromosomas. Como las roturas en la doble cadena de DNA, aunque sean pocas, incapacita a la célula a sufrir mitosis, la fragmentación del DNA puede considerarse como una definición de muerte por apoptosis. Sin embargo, en algunos sistemas apoptóticos inducidos por Fas, se ha observado que las células enucleadas artificialmente pueden morir por apoptosis, lo que demuestra que el núcleo y la cromatina no son siempre necesarios.

La degradación oligonucleosómica del DNA en el núcleo de células apoptóticas se consigue mediante la acción de caspasas activas. El proceso de fragmentación lo realiza una DNasa activada por caspasa, denominada CAD. Cuando CAD se sintetiza, ICAD se une a la cadena nascente de CAD para permitir su correcto plegamiento. ICAD permanece formando complejo con CAD, lo cual inhibe la actividad DNasa de CAD y enmascara su señal de localización nuclear manteniendo a CAD en el citoplasma. Por tanto, en condiciones normales CAD existe como complejo inactivo formando complejo con ICAD (inhibidor de CAD). Cuando el estímulo apoptótico activa las caspasas, incluyendo a la caspasa-3, se rompe la unión ICAD/CAD, y una vez que CAD queda libre puede entrar en el núcleo y actuar como Dnasa con una elevada actividad específica, comparable o mayor que la Dnasa I o DNasa II, y degrada rápidamente al DNA cromosómico. ICAD no es un inhibidor, más bien es una carabina molecular, porque CAD solo se expresa en presencia de ICAD (Figura 10).

Otros procesos se asocian con la CAD para acelerar la apoptosis. Por ejemplo.

- la inactivación de enzimas implicadas en la reparación del DNA,
- la inactivación de enzimas implicadas en la replicación del DNA, y
- la rotura de proteínas nucleares estructurales.

El enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa o PARP, fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP está implicada en la reparación del DNA dañado, y funciona sintetizando la poli(ADP-ribosa), que se une a las cadenas rotas de DNA y modifica a las proteínas nucleares. Esta capacidad de la PARP de reparar las lesiones del DNA desaparece por efecto de las caspasas.

La DNA topoisomerasa II es un enzima nuclear esencial para la replicación y reparación del DNA. Las caspasas inactivan este enzima y conducen a la lesión del DNA.

Las laminas son proteínas intranucleares que mantienen la forma del núcleo y median interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear. La degradación de las laminas por la caspasa-6 origina la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, normalmente observada en células apoptóticas.

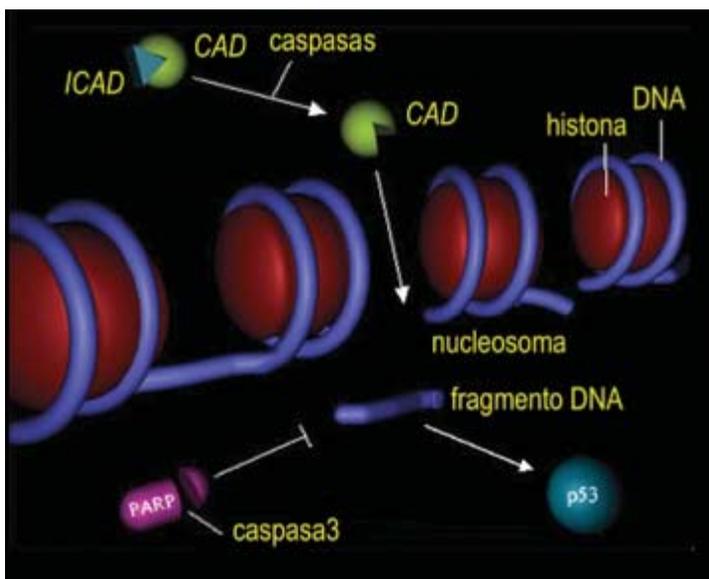


FIGURA 10. Degradación del DNA catalizada por la CAD.

## ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA APOPTOSIS

Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, existen diversos activadores (citocromo c, smac/diablo, AIF, BIR3) e inhibidores (IAP, Hsp, Bcl-2, BclXL, etc). La apoptosis puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, lo que demuestra que, para su iniciación y progresión, son necesarias una serie de proteínas

La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlada por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales son apoptóticas y otras antiapoptóticas. Las células están protegidas frente a los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (relacionados con CED-9), los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. Son factores antiapoptóticos la proteína Hsp70 y las IAP. La Hsp70 secuestra Apaf-1 y con ello impide la formación del apoptosoma. Las IAP bloquean la actividad de las propias caspasas (Figura 11).

La inhibición de la apoptosis es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos superiores. Durante el ciclo de vida normal la proteína inhibidora IAP, tiene una amplia capacidad *antiapoptótica* por silenciar la actividad de las caspasas. IAP fue identificada como proteína vírica que inhibe la muerte celular. Se caracteriza por poseer uno o más dominios muy conservados de 70 aminoácidos que contienen motivos en dedos de zinc, denominados repeticiones baculovíricas (BIR) esenciales para la actividad antiapoptótica. Existen unos cinco miembros de esta familia: cIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP y survivina. Su acción está bloqueada por smac/diablo

El miembro prototipo de la familia Bcl-2 es un oncogén, identificado en leucemia humana de células B (B cell leukemia). Existen proteínas Bcl-2 proapoptóticas y an-



## EL SUICIDIO CELULAR DEFIENDE EL ORGANISMO

La relación entre apoptosis y cáncer fue apreciada por primera vez, hace más de treinta años, por Kerr y sus colaboradores, quienes observaron que el ritmo del crecimiento de los tumores era muy pequeño si se comparaba con sus índices mitóticos. Cuando se descubrió que otro proceso diferente a la necrosis podía ser responsable de este fenómeno, fue cuando comenzó la «era de la apoptosis». Recientemente es mucho lo que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos que relacionan apoptosis y cáncer y es ahora posible conectar las actividades de los reguladores de la apoptosis con el desarrollo tumoral. Es un hecho reconocido que las células cancerosas pueden evadir la respuesta apoptótica y sobrevivir para formar tumores. Así que existen ya evidencias que establecen una relación entre algunos genes que intervienen en la regulación de la apoptosis y los que intervienen en el desarrollo del cáncer. Los dos ejemplos más conocidos de estos genes son los que codifican la proteína p53 y los miembros de la familia Bcl-2 (figura 12).

La proteína p53 supresora tumoral es un factor de transcripción que controla el estado del DNA, e inhibe la progresión del ciclo celular si existe alguna lesión en esta molécula. La mutación de p53 se asocia con muchos cánceres humanos y los ratones knocked out en las dos copias de p53 desarrollan numerosas enfermedades malignas.

Una vez lesionado el DNA, por ejemplo por estrés celular, radiación gamma y fármacos genotóxicos, la p53 se eleva y las células en proliferación se detienen en G1. Esto proporciona un lapso de tiempo para que se verifique la reparación del DNA, antes de que se verifique la siguiente ronda de replicación. La parada del ciclo celular está mediada por estimulación de la expresión de la proteína p21<sup>CIP1</sup>, inhibidora de la ciclina quinasa. De mantenerse las concentraciones elevadas de p53 por un prolongado tiempo se desencadena la apoptosis por inducción de la expresión de Bax y las proteínas BH3, Noxa y PUMA, reguladas por p53. Sin embargo, la sobreexpresión de Bcl-2 contrarresta el efecto apoptogénico de p53. Existe alguna evidencia que demuestra que p53 induce la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden estimular la apoptosis mitocondrial.

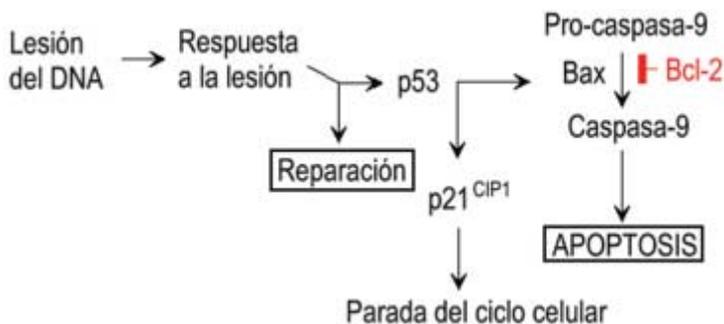


FIGURA 12. *Papel de las proteínas p53 y Bcl-2 en la ejecución de la apoptosis.*

## CONCLUSIONES

Son ya muchas las evidencias que conectan la apoptosis con la enfermedad. El desafío real ha de tomar esta información y traducirla en efectivas terapias. La terapia relacionada con la apoptosis ha de ser inducir la muerte de células no deseadas (por ejemplo, en cáncer), usando la apoptosis como una herramienta eliminadora, o preservar las células irremplazables (por ejemplo las neuronas) necesarias para mantener la función de un órgano. Los miembros de la vía mitocondrial son potencialmente excelentes dianas para terapias inducidas por apoptosis, ya que la mitocondria integra señales de vías de supervivencia (citoquinas, Bad) y de muerte (p53 y Bax). En cada ambiente celular la mitocondria responde de manera apropiada en base a los niveles de influencias presentes, estabilizando la membrana (Bcl-2, Bcl-XL) o distorsionándola (calcio, ROS, BAX). La mitocondria amplifica la respuesta apoptótica liberando inductores apoptóticos con capacidad de iniciar la cascada de las caspasas y la permeabilización de la membrana. Efectores de la apoptosis mitocondrial se encuentran en todos los tipos celulares y parece que se conservan incluso en las células tumorales. Existe una serie de sustancias que inducen eficientemente la liberación del citocromo c mitocondrial, iones y pequeñas moléculas (calcio, NO, ROS). Finalmente, la permeabilización de las membranas juega un papel crítico en los mecanismos de diversos agentes quimioterapéuticos y toxinas celulares.

Las terapias apoptóticas dirigidas a la mitocondria pueden ser útiles en enfermedades proliferativas, como el cáncer, sin embargo los agentes que actúan a nivel de mitocondria pueden no ser útiles en terapias donde la prevención de la apoptosis es el objetivo. La mitocondria juega un papel central en la vía apoptótica intrínseca, mientras que la vía apoptótica extrínseca es independiente de la mitocondria. Por tanto, puede ser más beneficioso bloquear el programa apoptótico en puntos comunes a ambas vías, por ejemplo en las caspasas.

La mayor parte de los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular programada y las vías de señalización implicadas en dichos mecanismos, se han conseguido a nivel celular en experimentos *in vitro*. La apoptosis y su interacción con otros procesos en organismo completo, es un problema mucho más complejo. Es imperativo que conozcamos estos mecanismos *in vivo* porque son muchas las enfermedades que se originan como consecuencia de defectos en la regulación de la apoptosis. Una vez que se logren estos conocimientos se conseguirá estar capacitado para diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención y progresión de muchas enfermedades.

## AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento a los Doctores Evangelina Palaciós Aláiz, Isabel Sanchez Reus y David Andrés García por su inestimable ayuda en la revisión del manuscrito. También agradezco Dolores Velasco Pérez su eficaz colaboración en la preparación del texto y las figuras.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acehan. D. *et al.* (2002). Three dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**: 423-432.
- Adams, J.M. and Cory, S. (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochem. Sci.* **26**: 61-66.
- Adrian, C. and Martin S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochem. Sci.* **26**: 390-397.
- Baud, V. and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* **11**: 372-377.
- Beere, HM y Green DR (2001). Stress management, heat shock protein 70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biol* **11**, 6-10
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mossen DD, Manboubi A, Kuwana T, Taitor P, Morimoto RI, Cohen GM y Green DR (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* **2**: 469-475.
- Cascales M (1996) Muerte Celular Programa-da. *INDUFARMA* **20**, 26-30, 1996.
- Cascales M, (1997) Apoptosis, Enfermedad y Terapéutica. *Anal Real Acad Doctores* **1**, 23-54.
- Chai, J, Wu O, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES y Shi Y (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen. Mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* **107**: 399-407.
- Chai, J Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu O, Datta P, Alnemri ES, Shi Y y Datar P. (2001). Structural basis of Caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**: 769-780.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A y Olson MZ (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK1. *Nature Cell Biology* **3**: 339-345.
- Deng Y, Lin Y y Wu X. (2002). TRAIL induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* **16**: 33-45.
- Díez-Fernández, C., García, D y Cascales, M (2002) Attenuating effect of heat shock against TGF- $\alpha$ 1-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Rad Biol Med* **33**, 835-846.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L y Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.* **68**: 383-424.
- Ellis HM y Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG y Green DR. (1999). Bax induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X<sub>L</sub>. *J. Biol. Chem.* **274**: 2225-2233.
- Joza N, Kroemer G, Penninger JM. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* **18**, 142-149
- Joza, N, Susin, SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK *et al.*, (2001) Essential role of the mitochondrial Apoptosis Inducing Factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-554.
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. (1999). *c-myc* induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c. *Genes Dev.* **13**: 1367-1381.

- Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Korf, I., Fan, Y.A. and Strome, S. (1998). The polycomb group in *C. elegans* and maternal control of germline development. *Development* **125**: 2469-2478.
- Kumar, S. and Colussi, P.A. (1999). Prodomains, adaptors oligomerization: the pursuit of Caspase interaction in apoptosis. *Trends in Biochem. Sci.* **24**: 1-4.
- Martinou JC y Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 63-67
- Metzstein, M.M. and Horvitz, H.R. (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ced-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Molecular Cell* **4**: 309-319.
- Olson M y Kornbluth S (2001) Mitochondrial in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med* **1**, 91-122
- 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.* **19**: 4310-4322.
- Renatus, M. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease, caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14250-14255.
- Riedl SJ, Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791-800.
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. (2000). Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nature Cell Biol.* **2**: 553-555.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* **2**: 476-483.
- Song Z, Guan B, Bergman A, Nicholson DW, Thornberry NA, Peterson EP, Steller H (2000). Biochemical and genetic interactions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr*, *hid* and *grim*. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2907-2914.
- Stennicke HR, Ryan CA y Salvesen GS. (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in Biochem. Sci.* **27**: 94-101.
- Strasser A, O'Connor L y Dixit VM. (2000). Apoptosis signalling. *Ann Rev Biochem.* **69**: 217-245.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM y Kroemer G. (1999) Molecular characterisation of mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF). *Nature* **397**, 441-446.
- Suzuki Y, Nakabayashi Y y Takahashi R. (2001). Ubiquitin protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *PNAS* **98**: 8662-8667.
- Vaux DL, and Korsmeyer SJ. (1999). Cell death in development. *Cell* **96**: 245-254.
- Verhagen AM, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53.
- Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT. (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease, DFF40 (caspase activated DNase) on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* **275**: 8226-8232.

- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**: 1008-1012.
- Yang X, Chang H y Baltimore D. (1998) Essential role of Ced-4 oligomerization in Ced-3 activation and apoptosis. *Science* **281**: 1355-1357.
- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. (2001). PUMA induces rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* **7**: 673-682
- Wyllie AH, Kerr JF y Currie AR (1980) Cell Death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306
- Zaragoza A, Díez-Fernández C, Andrés D, Alvarez AM, y Cascales M (2000) Cito-toxicidad de la cocaína: Especies reactivas de oxígeno y apoptosis. *Anal Real Acad Doctores* **4**, 137-170, 2000

## GLOSARIO

- AIF**, (apoptosis inducing factor), factor inductor de la apoptosis que se encuentra en la mitocondria en el espacio intermembranas y sale al citosol en respuesta a una señal apoptótica. Induce la degradación del DNA cromosómico independientemente de las caspasas.
- APAF-1**, factor activador de las proteasas apoptogénicas. Homólogo de la proteína CED-4 del *C. elegans*.
- APOPTOSOMA**, complejo oligomérico formado por Apaf-citocromo c y dATP, cuya misión es el reclutamiento y activación de la procaspasa 9
- Bak y Bak**, miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
- Bcl-XL**, miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
- Bcl-2**, miembro prototipo de la familia Bcl-2, identificado como producto del proto-oncogen *bcl-2* encontrado en ciertos linfomas de células B. Proteína de 25 kD, reside en la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial. No promueve el crecimiento celular *per se*, pero promueve la supervivencia celular.
- BH**, (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica
- BH3**, dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.
- BH4**, dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2
- Bid, Bik y Bim**, miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 que comparten la secuencia de homología sólo en el dominio BH3
- BIR**, (baculoviral IAP repeat) dominio muy conservado de 70 aminoácidos que es esencial para la actividad antiapoptótica de IAP
- CAD**, desoxirribonucleasa activada por caspasa (caspase-activated deoxyribonuclease)
- CARD**, dominio de reclutamiento de las caspasas
- CASPASAS**, cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticos que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a aspartato. Se conocen 14
- CED-4** (cell death determining-4), proteína supresora extragénica de la ganancia de función de la EGL-1
- $\Delta\Psi$** , potencial transmembrana de la membrana mitocondrial interna
- dATP**, desoxiadenosin trifosfato
- DD**, dominio específico de muerte situado en la porción intracelular del receptor, que se activa cuando la unión del ligando extracelular induce la oligomerización (trimerización) del receptor.

- DED**, dominio efector de muerte. El agrupamiento FADD con DED recluta la procaspasa-8, que también tiene DED en su porción N terminal (que corresponde a la CARD de la procaspasa-9)
- DOMINIO**, porción discreta de una proteína que se une independientemente al resto de la proteína y posee su propia función. Unidad estructural que puede encontrarse sola o con otros dominios o repeticiones. Relacionada evolutivamente. Se define por su estructura
- R5**, receptores de muerte a los que se une TRAIL
- EGL-1**, proteína codificada por *egl-1*, el primer gen descubierto de el sistema de la muerte celular programada, como una mutación de ganancia de función, que causa la muerte no programada de dos neuronas que inervan la vulva, produciendo un defecto en la puesta de huevos (egg laying defective)
- FADD**, dominio de muerte asociado a Fas
- FAS**, receptor de muerte
- FASL**, ligando del receptor de muerte Fas
- GRANDZIMA**, serina proteasa segregada por los linfocitos T
- IAP**, inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.
- ICAD/CAD**, heterodímero inhibidor/desoxirribonucleasa, que para actuar como desoxirribonucleasa activa necesita ser hidrolizada por caspasas para liberar CAD
- MÓDULO**, elemento compuesto por múltiples motivos en un segmento de contiguas secuencias
- MOTIVO**, región corta muy conservada en una secuencia proteica. Frecuentemente son partes muy conservadas de dominios
- MPTPC**, complejo mitocondrial del poro de permeabilidad transitoria
- NOXA**, proteína BH3
- PARP**, poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas
- PUMA**, proteína BH3
- Smac/DIABLO**, inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP
- TNF**, factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1
- TNFR-1**, receptor del TNF
- TRAIL**, ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF
- VDAC**, (voltaje dependent anion channel), canal aniónico dependiente de voltaje
- WD-40**, motivos
- XIAP**, proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis. Posee tres dominios BIR y un motivo dedo de zinc circular. Un solo dominio BIR es suficiente para la actividad apoptótica. Se expresa en la mayoría de los tejidos.