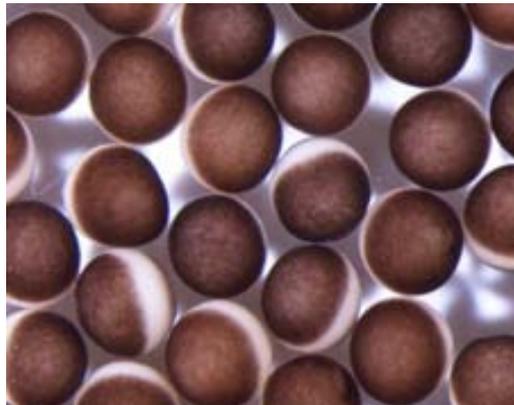


Mecanismos de regulación de la muerte del oocito por shock hiperosmótico



Tesis Doctoral

NABIL BEN MESSAOUD

Barcelona 2014



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Unidad de Bioquímica de Medicina

Mecanismos de regulación de la muerte del oocito por shock hiperosmótico

Memoria de tesis doctoral presentada por Nabil Ben Messaoud para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Trabajo realizado en la unidad de Bioquímica de Medicina del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y el Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. José Manuel López Blanco.

Doctorando

Director de tesis

Nabil Ben Messaoud

Dr. José Manuel López Blanco

Barcelona, 10 de marzo de 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis padres, a quienes dedico esta tesis. Sin vuestro apoyo no hubiese podido ni terminar este trabajo, ni la carrera, ni muchas de las cosas que me han servido para llegar hasta aquí. MUCHAS GRACIAS!

A mi director de tesis, José Manuel López Blanco, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral en su laboratorio, por su confianza en mi capacidad de hacer este trabajo, por haberme guiado durante los últimos cuatro años, por todas las sugerencias, consejos, comentarios y correcciones.

A mis compañeros de laboratorio Yue, Dani y Elena que de una manera o otra habéis contribuido a la realización de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento y del Instituto de Neurociencias, siempre dispuestos a darme toda su ayuda, ideas y reactivos.

A los doctores José Lizcano, Víctor Yuste y Jordi Ortiz por el seguimiento del desarrollo de la tesis durante estos años, por todos los comentarios, y todas las sugerencias.

A los miembros de secretaría del Instituto de Neurociencias y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por facilitarnos las tareas administrativas y estar siempre disponibles.

ÍNDICE

I) ABREVIATURAS.....	11
II) RESUMEN.....	15
III) INTRODUCCIÓN.....	19
1. Muerte celular	21
1.1. Apoptosis.....	21
1.2. Apoptosis inducida por shock hiperosmótico	24
1.3. Mecanismos de apoptosis.....	25
1.3.1. Vía extrínseca o mediada por receptores de muerte.....	26
1.3.2. Vía intrínseca o mediada por mitocondria	27
2. Elementos implicados en el proceso de apoptosis.....	29
2.1. Familia de proteínas caspasas	29
2.2. Familia de proteínas de Bcl-2.....	31
2.2.1. Proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2	32
2.2.2. Proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2	33
2.3. Citocromo c.....	34
2.4. Smac/DIABLO.....	35
2.5. Calpaínas.....	37
2.6. Factor inductor de apoptosis (AIF)	40
3. La vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	42
3.1. La vía de p38.....	44
3.2. La vía de JNK.....	48
4. <i>Xenopus laevis</i> como modelo experimental	50
4.1. <i>Xenopus Laevis</i>	50
4.2. Ventajas de utilizar el modelo de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> para estudiar la apoptosis	52
IV) OBJETIVOS	53
V) MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Aislamiento de los oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	59
2. Microinyección de los oocitos	60

3. Shock hiperosmótico con sorbitol.....	60
4. Lisis de oocitos.....	61
5. Fraccionamiento subcelular.....	61
6. Ensayos de actividad caspasa-3.....	61
7. Ensayos con los inhibidores.....	62
8. Western Blot	63
8.1. Separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS ..	63
8.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF.....	64
8.3. Incubación de la membrana con proteínas inespecíficas para bloquear los sitios de unión de anticuerpos a la membrana	64
8.4. Adición de un anticuerpo primario contra las proteínas que se quieren detectar	64
8.5. Adición de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, que reconoce al anticuerpo primario	65
8.6. Revelado.....	65
9. ``Stripping`` de membranas de PVDF	66
10. Técnicas de Biología Molecular	66
10.1. Extracción de RNA total de los oocitos	66
10.2. RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction).....	67
10.3. Clonaje de DNA	68
10.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	68
10.3.2. Vectores	69
10.3.3. Digestión del DNA	70
10.3.4. Ligación entre el inserto y el vector.....	70
10.3.5. Transformación de bacterias competentes	71
10.3.6. Secuenciación del DNA.....	71
10.4. Mutagénesis Dirigida de DNA.....	72
10.5. Purificación de DNA plasmídico	75
10.5.1. Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico (Miniprep).....	75
10.5.2. Purificación a media escala de DNA plasmídico (Midiprep)	75
10.5.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	75
10.5.4. Purificación de los productos de PCR o RT-PCR.....	75
10.6. Electroforesis en geles de agarosa.....	76
10.6.1. Electroforesis analítica.....	76
10.6.2. Electroforesis preparativa	76
10.6.3. Electroforesis de RNA en gel desnaturizante de formaldehído.....	76
10.7. Transcripción in Vitro de mRNA	77
11. Análisis Estadístico.....	77

VI) RESULTADOS	79
1. Propiedades básicas de la vía de señalización de p38 en respuesta al shock hiperosmótico con sorbitol	81
1.1. El shock hiperosmótico activa la vía de señalización de p38.....	81
1.2. La respuesta de p38 al shock hiperosmótico es ultrasensible y monoestable	82
1.3. Respuesta bimodal de p38 ante el shock hiperosmótico en oocitos individuales.....	84
1.4. La activación de caspasa-3 induce la fosforilación de p38.....	86
2. La inhibición de las vías de señalización de p38 y JNK por compuestos químicos reduce la apoptosis inducida por estrés osmótico	88
3. Papel de la vía de señalización de p38 en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico	91
3.1. La expresión del constitutivo activo de MKK6 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.....	91
3.2. La expresión de las isoformas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ y sus mutantes inactivos no modifican la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico	94
3.3. La expresión combinada de MKK6-DD y p38 β , p38 δ o p38 γ inhibe la aceleración de la apoptosis inducida por MKK6-DD.....	99
3.4. La expresión de un constitutivo activo de p38 β acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.....	101
4. Papel de la vía de señalización de JNK en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico	103
4.1. La expresión de un constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.....	103
4.2. JNK1-1 y JNK1-2 se activan durante el shock hiperosmótico con sorbitol	105
4.3. La expresión de un constitutivo activo de MKK7 junto con las isoformas JNK1-1 y JNK1-2 incrementa la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.....	108
5. Papel de Smac/DIABLO y la activación de calpaínas en la apoptosis inducida por estrés hyperosmótico	111
5.1. El shock hiperosmótico induce la salida rápida de Smac/DIABLO y la activación de calpaínas.....	111
5.2. La inhibición de calpaínas reduce la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3	115
5.3 El bloqueo de Smac/DIABLO inyectando un anticuerpo específico inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3	119
VII) DISCUSIÓN.....	121
1. Propiedades básicas de la vía de señalización de p38.....	123

<i>2. p38 y JNK regulan la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico..</i>	<i>125</i>
<i>3. Las calpaínas regulan la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico</i>	<i>130</i>
<i>4. Smac/DIABLO regula la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico</i>	<i>133</i>
<i>5. Coreografía de la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico</i>	<i>135</i>
VIII) CONCLUSIONES	139
IX) BIBLIOGRAFÍA	143

I) ABREVIATURAS

- **ADP:** adenosín bifosfato
- **AIF:** factor inductor de apoptosis
- **Akt/PKB:** proteína quinasa B
- **AMPK:** proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
- **Apaf-1:** factor activador de la proteasa apoptótica
- **ATP:** adenosín trifosfato
- **Bcl-2:** B-cell lymphoma 2
- **Bcl-x_l:** B-cell lymphoma-extra large
- **BH:** Bcl-2 homology
- **BIR:** baculoviral repeat IAP
- **BSA :** albúmina de suero bovina
- **cm :** centímetro
- **cDNA :** ácido desoxiribonucleico complementario
- **cPLA2 :** fosfolipasa A2 citosólica
- **°C:** grado centígrado
- **CAD:** caspase-activated deoxyribonuclease
- **Cdc42:** cell division control protein 42 homolog
- **C-Flip:** FLICE inhibitory protein
- **DAPI:** 4, 6-diamino-2-fenilindol
- **DISC:** complejo inductor de muerte
- **DNA :** ácido desoxiribonucleico
- **DMSO :** dimetil sulfóxido
- **DTT :** ditioneitol
- ***E. coli :*** *Escherichia coli*
- **EDTA :** ácido etilendiaminotetraacético
- **EGTA :** etilenglicol bis (β-aminoetiléter) N,N'-tetraacetato
- **ERK:** quinasa regulada por señal extracelular
- **FAD:** flavín adenín dinucleótido
- **g :** gravedades
- **h:** horas
- **H₂O :** agua
- **HEPES :** N-(2-hidroxi-etil)piperacina-N'-(2-ácidoetanosulfónico)
- **IAPs:** proteínas inhibidoras de la apoptosis
- **ICAD:** inhibitor of caspase activated DNase
- **IgG:** inmunoglobulina G
- **JNK :** quinasa c- Jun N-terminal
- **kDa :** kiloDaltons
- **kb :** kilobase
- **LB:** Luria Broth
- **M :** mol/litro
- **min :** minutos
- **MEKK1:** MAP quinasa quinasa quinasa 1
- **MKK:** MAP quinasa quinasa
- **ml :** mililitro
- **mM :** milimol/litro
- **mRNA :** ácido ribonucleico mensajero
- **MAPK :** proteína quinasa activada por mitógenos
- **MOPS :** 3-[N-morpholino]propano sulfónico
- **MBS :** Modified Bath's Saline

- **NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido
- **NFkB:** factor nuclear de transcripción kB
- **ng :** nanogramo
- **nl :** nanolitro
- **o/n :** overnight
- **p53:** proteína supresora de tumores
- **PARP:** poly-ADP-ribose polymerase
- **PCR :** reacción en cadena de la polimerasa
- **pH :** potencial de hidrógeno
- **PM :** peso molecular
- **PMSF :** fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **PSA :** persulfato amónico
- **PVDF:** fluoruro de polivinilideno
- **Rac:** Ras-related c3 botulinum toxin
- **Rho:** Ras homolog
- **RNA :** ácido ribonucleico
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno
- **rpm :** revoluciones por minuto
- **RT:** transcripción reversa
- **SDS :** dodecilsulfato de sodio
- **seg :** segundos
- **Smac/DIABLO:** Second mitochondria-derived activador of caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI
- **TAK1:** TGF- β -activated kinase
- **TBS-T:** tris tampón salino con Tween 20
- **TEMED :** N,N,N,N'-tetrametiletlenodiamina
- **TPA:** 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
- **Tris :** 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol
- **Tween 20 :** polioxietileno sorbitan monooleato
- **V :** voltio
- **wt :** wild type
- **XIAP:** X-linked inhibitor of apoptosis
- **μ l :** microlitro
- **μ g:** microgramo
- **μ M:** micromol/litro

Las abreviaturas con menos frecuencia de uso se definen después de su primer uso en el texto.

II) RESUMEN

Las proteínas quinasas p38 y JNK se activan por diversos tipos de estrés ambiental, tal como la radiación UV y el shock hiperosmótico, y regulan múltiples procesos biológicos, entre ellos la proliferación y la muerte celular. El conocimiento de algunas propiedades básicas de estas proteínas quinasas, como la ultrasensibilidad, histéresis y respuesta digital, es importante para el control de los procesos irreversibles. Resultados previos de nuestro grupo han mostrado que el estrés hiperosmótico induce apoptosis en los oocitos de *Xenopus laevis* y activación de las proteínas quinasas AMPK y JNK. Mediante el uso de este modelo celular, se muestra que p38 también se activa por shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus*, que tiene un comportamiento ultrasensible, que no presenta histéresis, y que la activación a nivel de célula individual es bimodal. Por otro lado, se describe el papel de las proteínas quinasas de estrés p38 y JNK, así como la contribución de Smac/DIABLO y las calpaínas, en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. La inhibición de la vía de p38 con los compuestos SB203580 o BIRB796, o bien la inhibición de la vía de JNK con SP600125, no afectan a la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, mientras que la inhibición simultánea de la vía de p38 y JNK con SP600125 + BIRB796 inhibe parcialmente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3. El shock hiperosmótico induce la activación de p38 α , p38 β , y p38 γ . La expresión de un constitutivo activo de MKK6 acelera la apoptosis inducida por shock hiperosmótico, efecto que es inhibido por SB203580 o por BIRB796. Además, la expresión de un constitutivo activo de p38 β acelera la activación de caspasa-3 y la salida de citocromo c inducida por el estrés osmótico, indicando que la isoforma β tiene un papel más pro-apoptótico que el resto de isoformas. La expresión de un constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock osmótico, efecto que es parcialmente inhibido por SP600125 y con mayor claridad por SB203580 y BIRB796, indicando que ambas vías de señalización (JNK y p38) regulan la apoptosis de los oocitos. Por otro lado, el shock hiperosmótico induce la activación de JNK1-1 y JNK1-2 en los oocitos de *Xenopus*, y la expresión de un constitutivo activo de MKK7 junto con JNK1-1 o JNK1-2 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Además, el shock hiperosmótico induce la salida rápida de Smac/DIABLO mitocondrial y la activación de las calpaínas. La inhibición de las calpaínas reduce la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3. El bloqueo de Smac/DIABLO inyectando un anticuerpo específico inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3, indicando que la salida temprana de Smac/DIABLO mitocondrial regula la salida tardía de citocromo c. El inhibidor general de caspasas Z-VAD.fmk retrasa la apoptosis inducida por el estrés hiperosmótico, de forma

independiente a la caspasa-3, sugiriendo que alguna otra caspasa podría ser activada antes de la salida de citocromo c. En resumen, la activación sostenida de las proteínas quinasas de estrés p38 y JNK, junto a la salida rápida de Smac/DIABLO al citosol y la activación de las calpaínas son responsables de la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.

III) INTRODUCCIÓN

1. Muerte celular

La muerte celular es un componente importante durante el desarrollo del organismo multicelular adulto, permite la homeostasis de los tejidos, la eliminación de las células dañadas, así como la regulación del sistema inmune (Jacobson *et al.*, 1997; Rathmell and Thompson, 2002; Steller, 1995).

La presencia de un equilibrio entre la proliferación celular y la desaparición o muerte celular es de importancia vital para todos los metazoos durante el desarrollo y la edad adulta, con el fin de mantener un tamaño constante (Maddika *et al.*, 2007). En consecuencia, la pérdida o alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer cuando la proliferación se encuentra aumentada, mientras que la muerte celular excesiva está implicada en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (Green and Martin, 1995; Thompson, 1995).

La descripción de la muerte celular de origen patológico y fisiológico fue desarrollada en 1842 mediante las observaciones de Vogt sobre la metamorfosis de anfibios. En 1972, Kerr, Wyllie y Currie implantan el término apoptosis, ampliamente utilizado en nuestros días, que proviene de la expresión griega "la caída de las hojas desde un árbol en otoño" y se refiere a un mecanismo de selección celular evolutivamente conservado. Estos autores propusieron la clasificación de los procesos de muerte celular en dos categorías: la apoptosis, que es un proceso de muerte controlado; y la necrosis como una forma de muerte celular rápida y violenta iniciada por estímulos ambientales (Kerr *et al.*, 1972).

Muchos estudios han subdividido la muerte celular en tres categorías (apoptosis, autofagia y necrosis) basándose sobre criterios tales como las alteraciones morfológicas, tipo de señal de iniciación de la muerte, y la implicación de caspasas (Bialik *et al.*, 2010).

1.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es el proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extracelulares o intracelulares. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar una reacción inflamatoria masiva, ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas, o desconocidas, sin liberar su contenido al entorno y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades. Al contrario que la necrosis, la apoptosis es un proceso dependiente de ATP y no hay pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

Aproximadamente, 10 millones de células por día experimentan apoptosis en un ser humano adulto sano (Curtin and Cotter, 2003). Este mecanismo es necesario para mantener la homeostasis del organismo y para controlar el tamaño y la forma del tejido durante las diferentes etapas del desarrollo. También es un mecanismo de defensa, en las reacciones inmunitarias o cuando las células están dañadas por enfermedades o por la acción de agentes nocivos (Norbury and Hickson, 2001).

Las células que sufren apoptosis muestran una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que culminan en la condensación de cromatina, la rotura específica de proteínas celulares, exposición de fosfatidilserina, rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos, y formación de cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados por macrófagos, provocando que las células desaparezcan sin evidencia de reacción inflamatoria (Lauber *et al.*, 2004; Wyllie *et al.*, 1980).

Estos cambios tienen lugar mediante la activación de las caspasas, una familia de cisteín-proteasas que se activan específicamente en las células apoptóticas. Estas proteasas son responsables, entre otras cosas, de la desintegración del citoesqueleto, la eliminación del contacto célula-célula, y la activación de las endonucleasas encargadas de la degradación del DNA (Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997).

Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis:

- **Fase de iniciación o efectora:** La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, activa las caspasas, y pierde el contacto con las células vecinas. Se produce una pérdida del agua intracelular que conlleva la condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular; las células que inicialmente eran redondas aparecen elongadas, y generalmente, más pequeñas. La condensación de la cromatina nuclear empieza en la periferia nuclear. Estos cambios van acompañados del “blebbing” de la membrana plasmática (se forman unas burbujas llamadas ‘bleps’), y la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana.
- **Fase degradativa:** En esta fase las endonucleasas activadas por las caspasas degradan las proteínas, y se encargan de cortar el DNA en fragmentos nucleosomales y oligonucleosomales. Estos fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma (incluyendo orgánulos intactos), son empaquetados y envueltos por fragmentos de membrana plasmática. Estas estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, son emitidas por las células apoptóticas.

- **Fase de eliminación:** Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos o otras células vecinas atraídas por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas, impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando la inflamación.

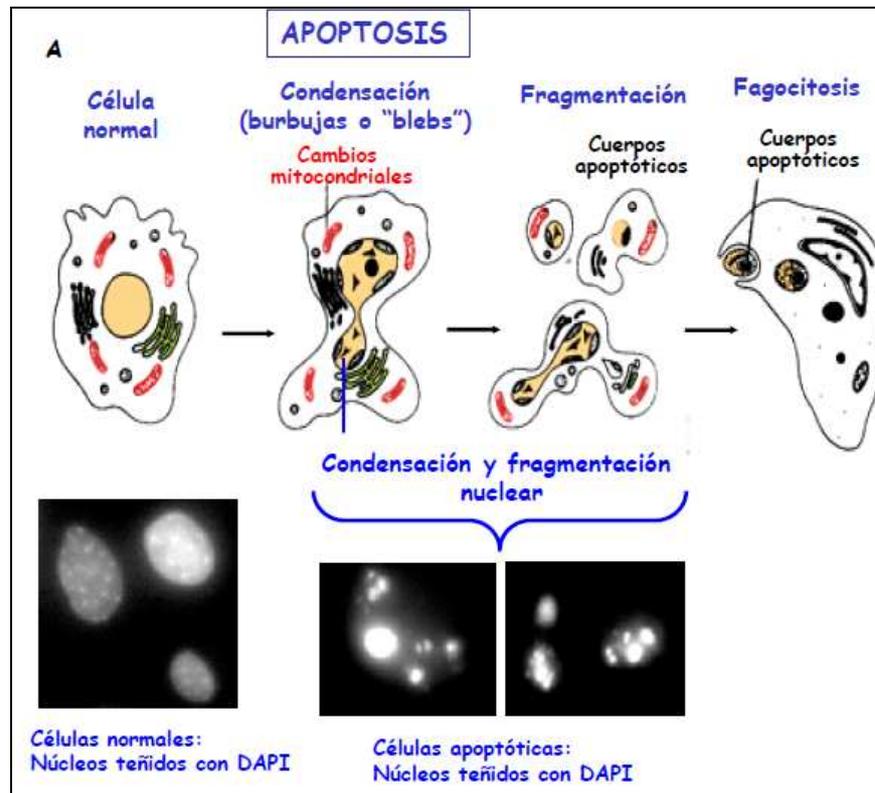


Figura 1. Muerte celular por apoptosis. Panel superior: fases del proceso de muerte por apoptosis. Panel inferior: imágenes del microscopio óptico mostrando núcleos teñidos con DAPI de células normales o apoptóticas. En este último caso, los núcleos aparecen condensados o fragmentados (Porras and Marzo, 2010).

Algunos de los factores apoptogénicos más conocidos que desencadenan la apoptosis son: daño celular causado por radiaciones ionizantes (Stevenson *et al.*, 1994), radiación UV (Zhang *et al.*, 2009a), activación de receptores de la muerte de la membrana celular (Fas, TNF) (Ashkenazi, 2002; Schutze *et al.*, 2008), eliminación de señales de crecimiento (Letai, 2006), infección vírica, toxinas bacterianas (Lancellotti *et al.*, 2009), factores de transcripción (p53), agentes citotóxicos (Solary *et al.*, 2000), y shock osmótico (Brocker *et al.*, 2012).

1.2. Apoptosis inducida por shock hiperosmótico

El shock hiperosmótico tiene muchos efectos dañinos sobre las células mediante la promoción de flujo de agua fuera de la célula, provocando el encogimiento celular, y la deshidratación intracelular (Reinehr and Haussinger, 2006). Las células responden al shock hiperosmótico con adaptaciones moleculares compensatorias que les permiten restablecer la homeostasis y la función celular (Kultz and Burg, 1998). Algunos tipos celulares responden al estrés osmótico mediante un cambio en sus fenotipos, o mediante el inicio de la muerte celular programada cuando se excede su tolerancia umbral (Kultz *et al.*, 1998). Si las células ya no son capaces de compensar el estrés hiperosmótico y la cantidad de daño es demasiado grande, pueden desencadenar un programa de autodestrucción llamado apoptosis. La ventaja selectiva de este mecanismo reside en la eliminación de las células dañadas o potencialmente malignas del organismo (Kultz *et al.*, 1998).

Los cambios en la osmolaridad extracelular pueden contribuir a la iniciación y el desarrollo de varias enfermedades locales y sistémicas. Quemaduras de tejidos, deshidratación, golpes de calor, diabetes mellitus, hipernatremia, y uremia, se asocian con una elevada osmolaridad extracelular (Holtfreter *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1998).

Los pacientes con diabetes mellitus desarrollan a menudo retinopatía diabética, una enfermedad crónica de bajo grado inflamatorio que provoca el daño de la retina y usualmente causa una pérdida de visión que en muchos casos no puede ser revertida. Más del 80% de estos pacientes que han tenido la enfermedad durante más de 10 años han experimentado algún grado de retinopatía (Brocker *et al.*, 2012). El estrés osmótico causado por la acumulación de sorbitol se cree que juega un papel importante en las complicaciones microvasculares asociadas con la retinopatía diabética (Lorenzi, 2007)

Se ha descrito que el estrés hiperosmótico estimula la apoptosis en cultivos de varios tipos de células de mamífero, incluyendo células de médula renal, células de neuroblastoma humano SH SY5Y, timocitos y células epiteliales humanas de la cornea (Bortner and Cidlowski, 1996; Luo *et al.*, 2007; Matthews and Feldman, 1996; Michea *et al.*, 2000). Se ha visto que el estrés hiperosmótico puede promover una apoptosis rápida en cultivos de cardiomiocitos (Chiong *et al.*, 2010; Galvez *et al.*, 2001), fibroblastos NIH 3T3 (Friis *et al.*, 2005), y en las líneas celulares HCT116 y Hela (Criollo *et al.*, 2007).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, que varían en función del tipo celular considerado: generación temprana de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular humana de leucemia mielógena

crónica K562 (Aquilano *et al.*, 2007), activación del receptor CD95/Fas mediada por un incremento rápido de ceramida y ROS (Reinehr *et al.*, 2006;Reinehr *et al.*, 2002), incremento de ceramida y entrada de Ca^{2+} en los eritrocitos humanos (Lang *et al.*, 2004), activación de las vías de señalización JNK y ERK en células epiteliales humanas de la córnea (Luo *et al.*, 2007), activación de AIF en las células HCT116 (Criollo *et al.*, 2007). Se ha visto, por tanto, que el shock hiperosmótico prolongado puede activar tanto las vías de señalización de apoptosis extrínsecas como intrínsecas (Burg *et al.*, 2007).

Los estudios anteriores indican una variabilidad de mecanismos dependiendo del tipo celular considerado. Sin embargo, para un tipo celular en concreto no se han definido en detalle cuantos mecanismos actúan al mismo tiempo, o de forma progresiva y coordinada, y cual es la relevancia de estos mecanismos. Los estudios suelen centrarse en un mecanismo en concreto, sin tener en cuenta la integración de varias vías de señalización que son activadas por el shock hiperosmótico. Por otro lado, los estudios realizados con líneas celulares modificadas, que tienen una elevada tasa de proliferación, pueden no ser representativos de lo que ocurre en las células y tejidos en situaciones fisiológicas.

1.3. Mecanismos de apoptosis

La ejecución de la apoptosis por diversos estímulos extracelulares o intracelulares se inicia a través de dos vías: la vía extrínseca o de los receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas conducen a una serie de eventos que culminan a la activación de las caspasas y la liberación de diversos mediadores de la apoptosis a partir de la mitocondria.

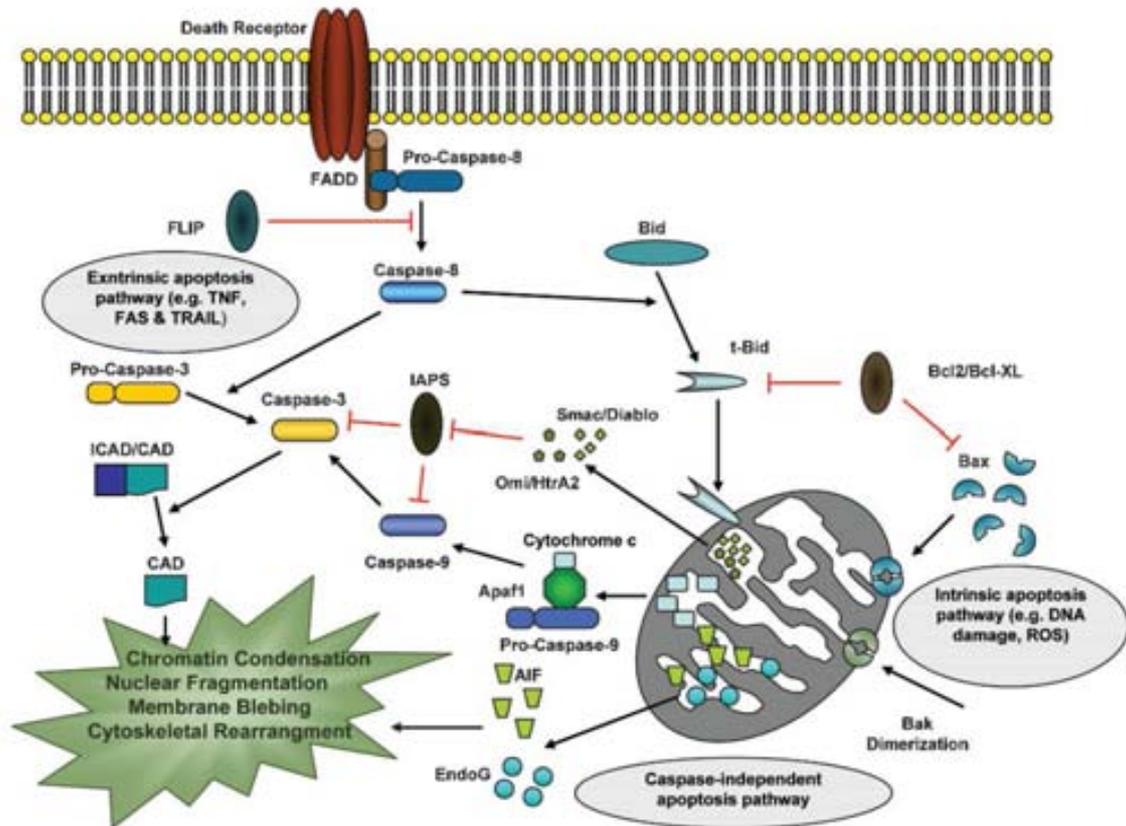


Figura 2. Mecanismos de la activación de la apoptosis: La vía extrínseca y la vía intrínseca. (Ghavami *et al.*, 2009)

1.3.1. Vía extrínseca o mediada por receptores de muerte

La ruta extrínseca se inicia por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la membrana que presentan un dominio de muerte pertenecientes a la superfamilia de los receptores para el factor de necrosis tumoral tipo 1 (Locksley *et al.*, 2001), tales como:

- Fas (Fibroblast associated antigen) también conocido como CD95 o Apo-1.
- TNF (Tumor necrosis factor).
- TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand).

Cada tipo de receptor tiene una estructura específica correspondiente que se llama ligando de muerte (death ligand). La unión del ligando al receptor induce la oligomerización del receptor y la formación del complejo inductor de muerte (DISC) (Ashkenazi and Dixit, 1998; Kischkel *et al.*, 1995), donde la proteína adaptadora FADD y/o TRADD se une con su dominio de muerte (DD) a un dominio de muerte de la región citoplasmática de los receptores (Boldin *et al.*, 1995). La interacción del complejo inductor de muerte (DISC) con el dominio efector de muerte (DED) de la procaspasa 8 o 10, lleva a la activación de estas caspasas iniciadoras, gracias a la formación de un heterotetrámero, que consta de dos

subunidades grandes y dos pequeñas (Debatin and Krammer, 2004), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas efectoras, tales como la caspasa 3, 6 y 7. Estas caspasas activan las DNAsas citoplasmáticas que migran al núcleo y degradan el DNA, lo cual conduce a la ejecución de la muerte por apoptosis (Hengartner, 2000; Medema *et al.*, 1997).

El complejo inductor de muerte (DISC) puede ser inhibido por la expresión de c-FLIP, un dominante negativo fisiológico de la caspasa 8, que conduce a la formación de un DISC inactivo (Li and Yuan, 2008).

1.3.2. Vía intrínseca o mediada por mitocondria

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por distintos tipos de estrés extracelulares o intracelulares, incluyendo el estrés oxidativo, la irradiación, o el tratamiento con fármacos citotóxicos (Ghavami *et al.*, 2008; Ghavami *et al.*, 2004).

La vía intrínseca está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2 ejerciendo su acción sobre la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Cory and Adams, 2002), permitiendo la liberación de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol (Kim, 2005; Saelens *et al.*, 2004).

El primer grupo consiste en la liberación del citocromo c, Smac/DIABLO, y HtrA2/Omi (Du *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2002). Estas proteínas activan la vía mitocondrial dependiente de las caspasas. El citocromo c liberado interacciona con Apaf-1, que se unirá a la procaspasa 9 formándose un complejo denominado apoptosoma que es la forma activa de la caspasa 9 (Hill *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 1999). Esta, a su vez activa a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), para desencadenar las últimas fases de la apoptosis (Li *et al.*, 1997). Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la activación de las caspasas mediante la inhibición de las actividades inhibitorias de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) (Schimmer, 2004; van *et al.*, 2002).

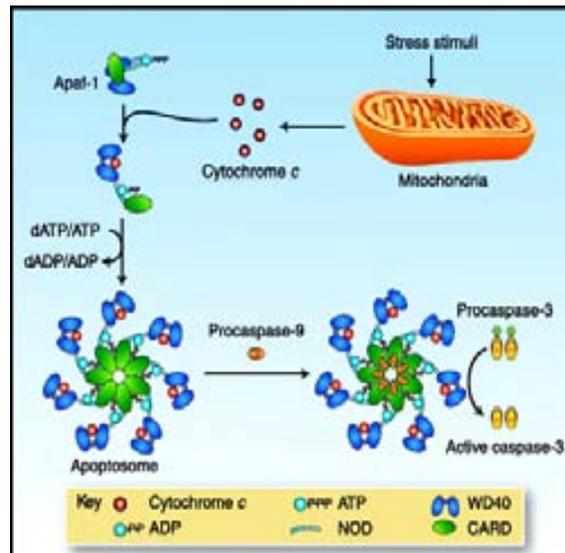


Figura 3. El citocromo c induce la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas: En las células sanas el citocromo c es secuestrado en el espacio intermembrana mitocondrial y Apaf-1 existe como un monómero inactivo en el citosol. En respuesta a estímulos de estrés (por ejemplo, daño en el DNA o los fármacos quimioterapéuticos) el citocromo c se libera desde la mitocondria al citosol donde se une a Apaf-1, provocando un cambio conformacional y la hidrólisis del enlace dATP/ATP de Apaf-1. En un proceso dependiente del intercambio de dATP/ATP a dADP/ADP, los heterodímeros de Apaf-1 y citocromo c se ensamblan para formar el apoptosoma, que proporciona una plataforma para la activación de la caspasa iniciadora procaspasa-9. La caspasa-9 activada proteoliza y activa las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3 (Ledgerwood and Morison, 2009).

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas, AIF y endonucleasa G, se liberan de la mitocondria durante la apoptosis. AIF se transloca al núcleo y provoca la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina nuclear (Joza *et al.*, 2001). La endonucleasa G también se transloca al núcleo donde proteóliza la cromatina nuclear produciendo fragmentos oligonucleosómicos del DNA (Li *et al.*, 2001). AIF y la endonucleasa G funcionan de una manera independiente de las caspasas (Elmore, 2007). Posteriormente se proteóliza ICAD por la caspasa 3 liberando a CAD, que se transloca al núcleo y conduce a la fragmentación oligonucleosomal del DNA y a una condensación más avanzada de la cromatina (Enari *et al.*, 1998).

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa 8 por dichos receptores, proteóliza la proteína Bid, generando la forma truncada de Bid (tBid) que se transloca a la mitocondria, activando los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak, dando lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial, e induciendo la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (Fan *et al.*, 2005; Ghavami *et al.*, 2009).

2. Elementos implicados en el proceso de apoptosis

2.1. Familia de proteínas caspasas

Las caspasas son cisteín-proteasas específicas que reconocen al menos cuatro aminoácidos en sus sustratos nombrados P4-P3-P2-P1, y digieren después del C-terminal del cuarto residuo (P1) debiendo ser este un ácido aspártico (Asp) (Li *et al.*, 2008; Shi, 2002). Estas proteínas en condiciones normales son inactivas y tras el estímulo apoptótico son activadas mediante proteólisis.

Las caspasas se sintetizan como proenzimas inactivas de cadena simple en la mayoría de las células, contienen un prodominio N-terminal de longitud variable que en su estructura contiene el dominio DED o CARD, un dominio que dará lugar a una subunidad catalítica grande con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, y un dominio correspondiente a una subunidad catalítica pequeña de 10 kDa (Fig. 4A) (Salvesen and Riedl, 2008). Su activación se debe al procesamiento proteolítico de estos dominios, seguido por la asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. A continuación, dos de estos heterodímeros se asocian para formar un heterotetrámero, con dos sitios catalíticos (Fig. 4B) (Rupinder *et al.*, 2007; Wolf and Green, 1999). Los residuos catalíticos de la díada de la subunidad p20 consisten en la Cys285, que forma parte de la secuencia del pentapéptido conservado 'QACXG', y la His237 (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Li *et al.*, 2008).

Una vez activadas, las caspasas pueden activar otras procaspasas, permitiendo la iniciación de una cascada de proteasas. Esta cascada proteolítica, amplifica la vía de señalización de la apoptosis y por lo tanto conduce a la muerte celular rápida (Elmore, 2007).

Hay 14 miembros de la familia de las caspasas (Ghavami *et al.*, 2009; Stegh and Peter, 2001), que se dividen en tres grupos (Fig. 4A):

- Las caspasas iniciadoras de la apoptosis (2, 9, 8, 10), tienen predominios largos que contienen uno de los dos motivos de interacción proteína-proteína: el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). Se encuentran en la célula como monómeros y requieren dimerización o oligomerización para su activación (Salvesen and Abrams, 2004). El complejo inductor de muerte (DISC), el apoptosoma y la proteína p53 inducida con el dominio de muerte (PIDDosome) son el montaje de las plataformas de proteínas que pueden reclutar las caspasas 8/10, 9 y 2, respectivamente (Olsson and Zhivotovsky, 2011). Las caspasas

iniciadoras son las primeras en ser activadas en una vía de muerte celular, y constituyen la primera etapa en una cascada de un mínimo dos etapas mediante la activación de las caspasas ejecutoras (Boatright and Salvesen, 2003).

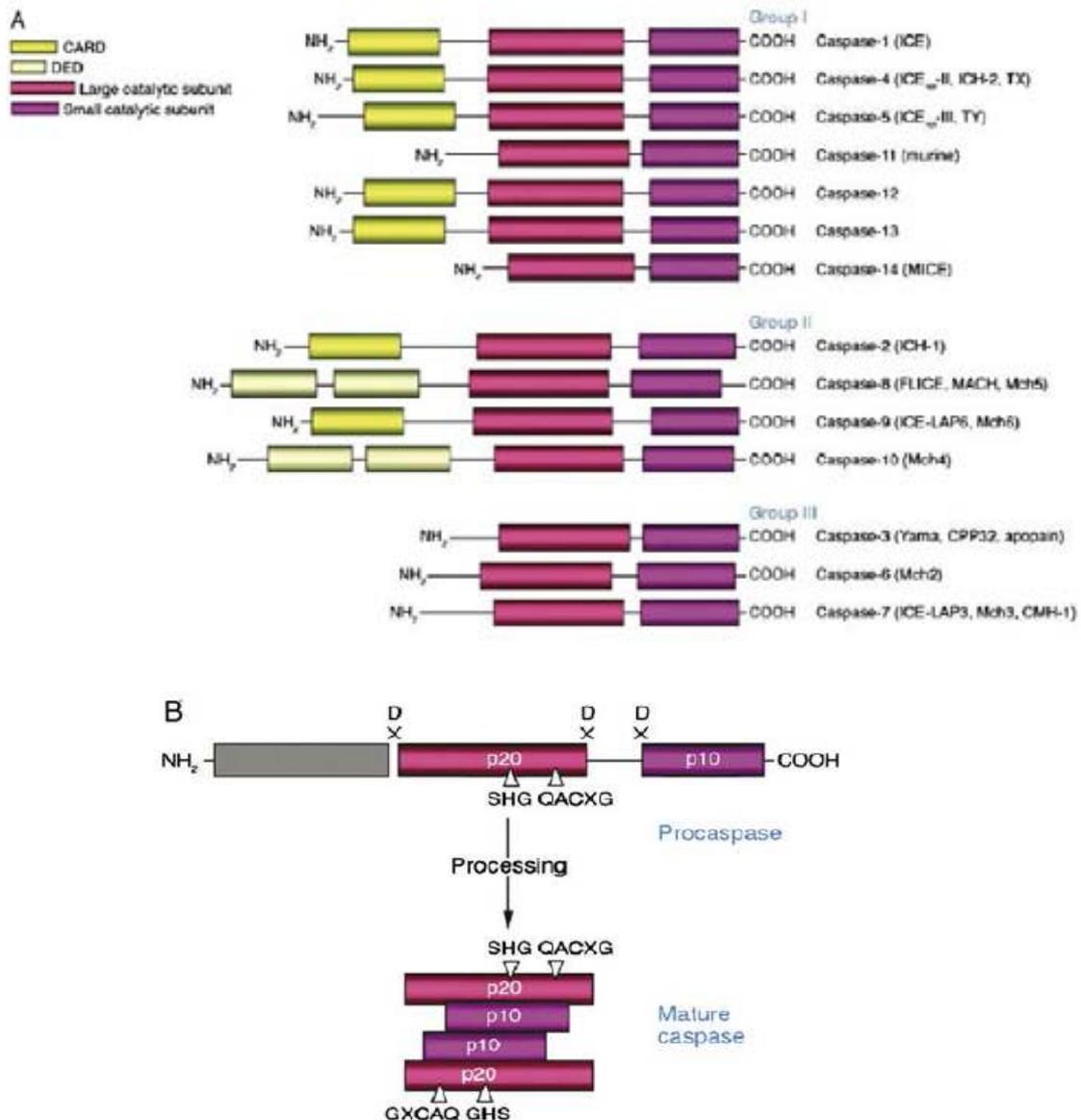


Figura 4. Estructura y función de la familia de las caspasas: (A) Presentación de los tres grupos de caspasas. Grupo I: caspasas inflamatorias. Grupo II: caspasas iniciadoras de la apoptosis. Grupo III: caspasas efectoras de la apoptosis. Los dominios CARD, DED, las subunidades grande (p20) y pequeña (p10) están indicados. (B) Esquema de la activación de la procaspasa. La escisión de la procaspasa en el enlace específico Asp-X conduce a la formación de la caspasa madura, que comprende el heterotetrámero p20-p10, y la liberación del prodominio. Se muestran los residuos que participan en la formación del centro activo (Rupinder et al., 2007).

- Las caspasas ejecutoras de la apoptosis (3, 6 y 7) tienen un predominio corto (menos de 30 aminoácidos), y se producen constitutivamente en las células como dímeros. Para que sean activas se requiere el procesamiento proteolítico por las caspasas iniciadoras, pero también pueden ser activadas por otras proteasas incluyendo catepsinas, calpaínas, y granzimas (Ghavami *et al.*, 2009; Rupinder *et al.*, 2007). Una vez activas, degradan múltiples sustratos celulares, incluyendo las proteínas estructurales y reguladoras de la célula en el núcleo, citoplasma, y el citosqueleto que conducen finalmente a la muerte celular (Shi, 2002; Wang *et al.*, 2005).
- Las caspasas inflamatorias, que son las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, presentan todas ellas predominios que contienen el dominio CARD y regulan la maduración de las citoquinas durante la inflamación. Sin embargo, existen importantes experimentos que indican un papel accesorio de estas caspasas en la apoptosis (Ghavami *et al.*, 2009). Se ha visto que la caspasa-11 regula la apoptosis y la maduración de citoquinas durante el shock séptico (Kang *et al.*, 2002), mientras que la caspasa-12 media la apoptosis inducida por el retículo endoplasmático (Nakagawa *et al.*, 2000; Szegezdi *et al.*, 2003).

2.2. Familia de proteínas de Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son los principales reguladores de la apoptosis, que residen inmediatamente “upstream” de las mitocondrias. Un ligero cambio en el equilibrio dinámico de estas proteínas puede conducir a la inhibición o la inducción de la muerte celular.

Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 se caracterizan por poseer entre uno y cuatro motivos conservados, denominados dominios homólogos a Bcl-2 (BH1-BH4), que se corresponden con secuencias α -hélice altamente conservadas (Adams and Cory, 1998; Scorrano and Korsmeyer, 2003), y que son importantes en la interacción heterodímera entre los miembros de la familia Bcl-2 (Danial and Korsmeyer, 2004). Muchos miembros de esta familia contienen también un dominio transmembrana (TM), que en el caso de Bcl-2 es necesario para su localización en las membranas, como la membrana mitocondrial externa (Gross *et al.*, 1999).

Sobre la base de diversas características estructurales y funcionales, la familia Bcl-2 se divide en proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas (Germain and Shore, 2003; Petros *et al.*, 2004).

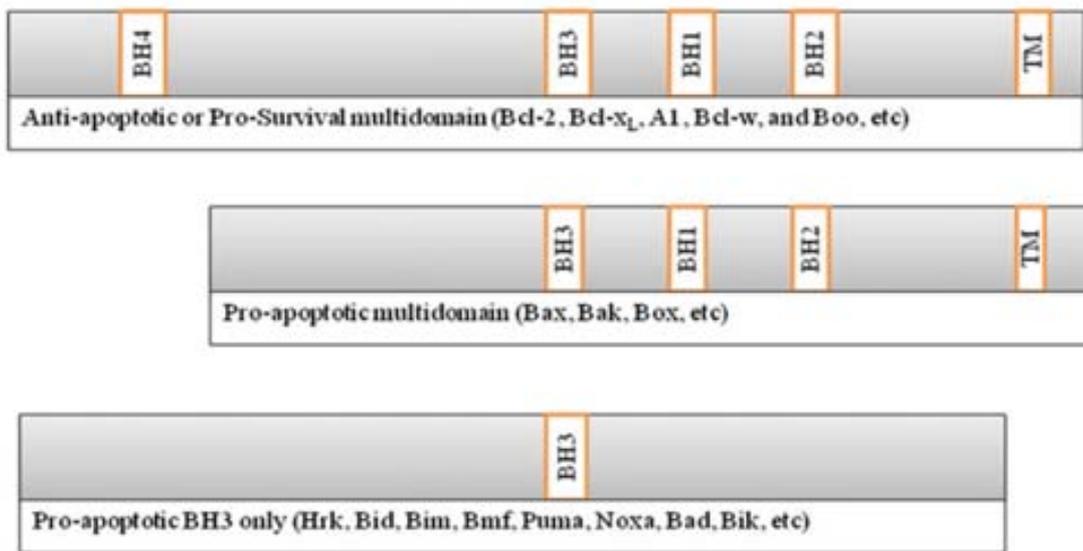


Figura 5. Esquema representativo de los miembros más importantes de la familia Bcl-2: Según los dominios conservados (BH) y su acción anti o pro-apoptótica, la familia Bcl-2 se puede dividir en tres subfamilias: anti-apoptótica, pro-apoptótica multidominio y pro-apoptótica con un solo dominio BH3. Algunos ejemplos de la familia de proteínas de cada grupo se citan en paréntesis. TM (dominio transmembrana) (Ola *et al.*, 2011).

2.2.1. Proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2

Los miembros anti-apoptóticos (Fig. 5) como Bcl-2, Bcl-x_L, A1, Bcl-w, y Boo tienen cuatro dominios BH (BH1-BH4). Mcl-1 es la única proteína anti-apoptótica con tres dominios BH (BH-1, -2, y -3). El dominio carboxi-terminal hidrófobo (TM) de estas proteínas anti-apoptóticas ayuda a anclarse a la cara citoplasmática de tres membranas intracelulares: la membrana mitocondrial externa, la envoltura nuclear, y el retículo endoplasmático (ER). Bcl-2 es una proteína integral de la membrana, mientras que Bcl-x_L y Bcl-w sólo se encuentran fuertemente asociadas con la membrana después de las señales citotóxicas que inducen cambios conformacionales para proteger a la célula (Ola *et al.*, 2011).

Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 disminuyen principalmente la apoptosis mediante la prevención de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), neutralizando la actividad de los miembros pro-apoptóticos (Youle and Strasser, 2008). Si Bcl-2 o Bcl-x_L no pueden ejercer sus propiedades antiapoptóticas, la oligomerización de Bax se lleva a cabo y se promueve la apoptosis.

2.2.2. Proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2

Las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 se dividen en dos subgrupos según el número de dominios homólogos BH (Fig. 5):

- El subgrupo de proteínas multidominios formado principalmente por Bax, Bak, y otras proteínas, poseen tres dominios homólogos (BH1-BH3). Bax y Bak son responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y son los principales efectores de la apoptosis, mientras que las células que carecen de Bax y Bak no pueden activar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, ni someterse a la apoptosis en respuesta a muchos estímulos de muerte (Wei *et al.*, 2001). Las proteínas Bax y Bak difieren en su localización intracelular antes de exponerse a un estímulo de muerte: Bak es una proteína integral de la membrana mitocondrial externa que está interaccionado con el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC-2) (Lazarou *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2009; Youle *et al.*, 2008), mientras que Bax reside como un monómero en el citosol o ligeramente unido a las membranas intracelulares (Scorrano *et al.*, 2003). La activación de Bax requiere su translocación y su integración en las membranas mitocondriales. Aproximadamente 10-15% de Bax o Bak están también localizados en el retículo endoplasmático (Scorrano *et al.*, 2003). La activación de Bax y Bak conduce a un cambio conformacional que expone el extremo N-terminal de las proteínas, que en el estado inactivo se encuentra oculto (Yethon *et al.*, 2003). La oligomerización de Bax y Bak provoca la formación de poros en la membrana mitocondrial externa (OMM), que induce la permeabilización y la liberación del contenido del espacio mitocondrial intermembrana (IMS), incluyendo Smac/DIABLO y citocromo c al citosol (Wang, 2001; Wei *et al.*, 2001). Se han propuesto varios modelos, que no analizamos aquí, de cómo las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas antagonizan las funciones de Bax, Bak, y la de las proteínas "BH3-only".
- La subfamilia de las proteínas pro-apoptóticas "BH3-only" (por ejemplo, Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 y Hrk/DP5), se caracterizan por presentar un único dominio BH3 como su nombre indica. Estas proteínas integran y transmiten señales de muerte a otros miembros de la familia Bcl-2. A través de su dominio BH3, estas proteínas interactúan con las proteínas anti-apoptóticas para inhibir su función y/o interactúan directamente con las proteínas multidominio tales como Bax o Bak para estimular su actividad (Martinou and Youle, 2011). Por ejemplo, está bien establecido que Bid truncado (tBid) conduce a la oligomerización de Bax y Bak, los

cuales forman poros en la OMM y permiten la liberación de proteínas del IMS al citosol (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000).

2.3. Citocromo c

El citocromo c es una proteína mitocondrial bien conocida que tiene un papel fundamental en la respiración mitocondrial participando en la transferencia de electrones de la cadena respiratoria para mantener la producción de ATP.

El citocromo c de los eucariotas es una pequeña hemo-proteína globular de 104 aminoácidos soluble en agua, altamente conservada en distintas especies, que tiene un peso molecular de aproximadamente 12 kDa (Kulikov *et al.*, 2012). Está codificada por un gen nuclear y es sintetizada como apo-citocromo c. Se transporta a través de la membrana mitocondrial externa (OMM) al espacio intermembrana, donde se convierte en holo-citocromo c por la holo-citocromo-c sintasa para dar lugar a la proteína madura con el grupo hemo covalentemente unido a la Cys-14 y 17 (Bayir *et al.*, 2006; Kulikov *et al.*, 2012), anclándose en la membrana interna directamente a cardiolipina, un lípido inusual confinado a la membrana mitocondrial interna. El citocromo c funciona como lanzadora de electrones desde el complejo III (citocromo c reductasa) al complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria.

Cuando las células entran en apoptosis, la localización y la función del citocromo c cambian radicalmente. Durante la activación de la maquinaria apoptótica, se libera de las mitocondrias al citosol para desencadenar la activación de la cascada de las caspasas en la vía apoptótica intrínseca, o amplificando los efectos activadores de la cascada de caspasas activada por la caspasa 8 durante la vía apoptótica extrínseca (Caroppi *et al.*, 2009; Ow *et al.*, 2008).

Durante el estrés, los miembros de la familia Bcl-2 regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial, y conducen a la liberación del citocromo c al citosol. Una vez en el citosol, el citocromo c se une al dominio C-terminal de la proteína Apaf-1 de una manera dependiente de dATP/ATP, promoviendo la oligomerización de Apaf-1 y el reclutamiento de la pro-caspasa-9, formándose un complejo multimolecular heptamérico conocido como apoptosoma. Cada apoptosoma puede reclutar siete dímeros de la caspasa-9 favoreciendo la activación de las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7), que proteólizan múltiples sustratos que eventualmente median las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Garrido *et al.*, 2006; Twiddy *et al.*, 2004).

Por otro lado, la liberación del citocromo c de las mitocondrias provoca una disfunción de la actividad de la cadena respiratoria, lo que lleva a la supresión de la fosforilación oxidativa. Además, esto produce un incremento de ROS mitocondrial, ya que la transferencia de electrones entre los complejos III y IV estará parcialmente bloqueada y los electrones de la cadena respiratoria empiezan a producir el radical superóxido (Cai and Jones, 1998).

El papel crucial del citocromo c en la inducción de la apoptosis se demostró en experimentos en donde la microinyección de esta proteína en el citosol de varios tipos celulares provocó la muerte celular apoptótica (Zhivotovsky *et al.*, 1998).

La sobreexpresión de Bcl-2 bloquea la liberación del citocromo c de la mitocondria e inhibe la iniciación de la apoptosis (Yang *et al.*, 1997). La deficiencia del citocromo c en ratón provoca letalidad embrionaria en la etapa intermedia de la gestación, confirmando su papel vital en el mantenimiento de la respiración mitocondrial (Li *et al.*, 2000).

2.4. Smac/DIABLO

Smac/DIABLO (‘‘Second mitochondria-derived activador of caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI’’) está codificado por un gen nuclear, y es sintetizado como una molécula precursora de 239 aminoácidos produciendo una proteína de 27 kDa. Los primeros 55 aminoácidos del dominio N-terminal constituyen un péptido señal de direccionamiento mitocondrial (MTS), que después de su importación en la mitocondria es proteólizado para generar la forma madura (25 KDa) de Smac/DIABLO, que se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (Du *et al.*, 2000).

En presencia de estímulos apoptóticos, Smac/DIABLO maduro se libera del espacio intermembrana mitocondrial al citosol (Munoz-Pinedo *et al.*, 2006), en donde tiene un efecto pro-apoptótico que está mediado por su interacción con los IAPs neutralizando su actividad inhibitoria, y favoreciendo así la activación de las caspasas y la apoptosis (Verhagen *et al.*, 2000; Wilkinson *et al.*, 2004). Datos estructurales han establecido que Smac/DIABLO requiere formar homodímeros para interactuar con los IAPs (Chai *et al.*, 2000). En particular, un motivo NH₂-terminal que consiste en cuatro aminoácidos Ala-Val-Pro-Ile es el responsable de la interacción con los IAPs (Chai *et al.*, 2000; Martinez-Ruiz *et al.*, 2008). La mutación del primer aminoácido hace que la proteína resultante sea inactiva (Chai *et al.*, 2000), aunque otros estudios sugieren que hay otras regiones que también son importantes (Cheng *et al.*, 2011).

La actividad de las caspasas está regulada negativamente por su interacción con las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Deveraux *et al.*, 1997; LaCasse *et al.*, 1998). Esta familia de proteínas está compuesta por varios miembros incluyendo XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 y survivina (Hunter *et al.*, 2007), que generalmente tienen tres dominios BIR (Baculoviral Repeat IAP) y un dominio RING (Really Interesting New Gene) (Deveraux and Reed, 1999). Cada uno de los dominios BIR1, BIR2, y BIR3 es capaz de inhibir las caspasas de forma independiente, y también cada uno interactúa con Smac/DIABLO (Qin *et al.*, 2012). El miembro más estudiado es XIAP, donde el dominio BIR2 y la región de enlace entre los dominios BIR1 y BIR2 se requieren para la inhibición de las caspasas 3 y 7, mientras que el dominio BIR3 inhibe la caspasa 9 (Shiozaki *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001a). Además, se ha determinado que el dominio RING de XIAP tiene actividad ubiquitina ligasa E3 hacia las caspasas, provocando su degradación por el proteosoma después de su interacción (Morizane *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2001b).

Se ha demostrado que Smac/DIABLO interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP mediante su motivo N-terminal, lo que permite la liberación de las caspasas 3/7 y 9, respectivamente, unidas a XIAP (Gao *et al.*, 2007; Srinivasula *et al.*, 2001). Smac/DIABLO monomérico puede unirse solamente a uno de los dominios BIR, mientras que un dímero de Smac/DIABLO puede unir simultáneamente a dos dominios BIR (Fig. 6) (Verhagen and Vaux, 2002).

Smac/DIABLO está involucrado en varios tipos de cáncer debido a que sus niveles pueden determinar la sensibilidad de las células cancerosas a la muerte apoptótica inducida por diversos estímulos. Las células tumorales normalmente exhiben niveles bajos de Smac/DIABLO y tienen resistencia alta a la apoptosis, por lo que la expresión de Smac/DIABLO está inversamente correlacionada con la sensibilidad a la apoptosis (Qin *et al.*, 2012). Un estudio reciente de pacientes con carcinoma hepatocelular ha demostrado que la expresión de Smac/DIABLO se reduce tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA en tejidos cancerígenos en comparación con los tejidos hepáticos normales, y que esta reducción se ha correlacionado directamente con la progresión del cáncer (Bao *et al.*, 2006). Además, la investigación sobre los tumores germinales de testículo han mostrado que los niveles de mRNA de Smac/DIABLO han disminuido significativamente durante la progresión del cáncer y el desarrollo de fenotipos malignos avanzados (Kempkensteffen *et al.*, 2007). Se observaron resultados similares en estudios de carcinoma de células renales (Kempkensteffen *et al.*, 2008; Kempkensteffen *et al.*, 2007), y cáncer del pulmón (Qin *et al.*, 2012; Sekimura *et al.*, 2004). Los niveles de expresión de Smac/DIABLO podrían ser

útiles como un marcador pronóstico o terapéutico (Martinez-Ruiz et al., 2008; Qin et al., 2012).

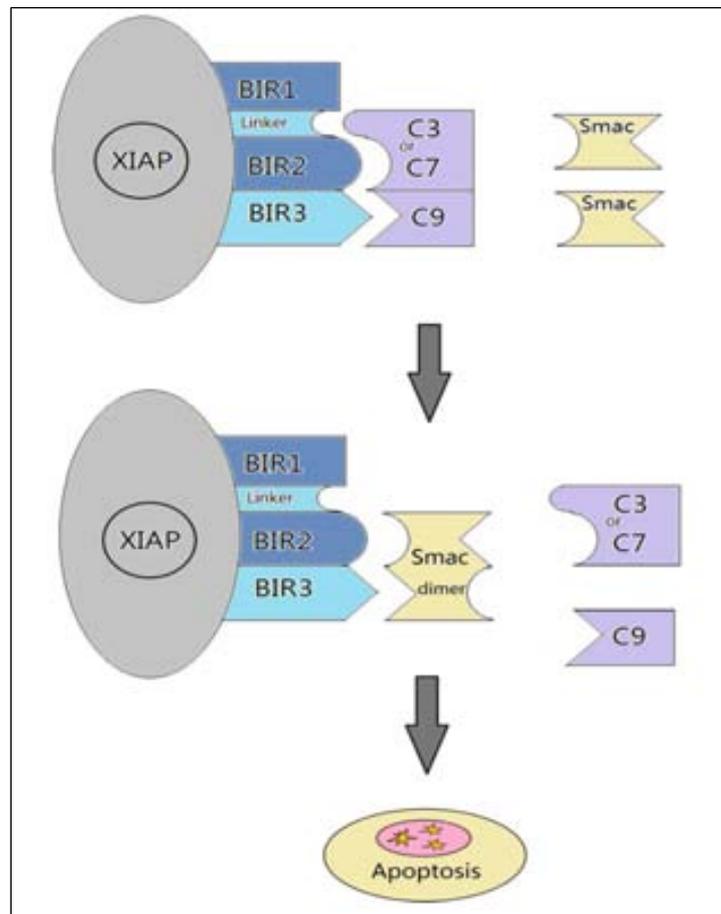


Figura 6. Esquema representativo del mecanismo de inhibición de XIAP por Smac/DIABLO: XIAP se une a través del dominio BIR2 y un enlazador entre los dominios BIR1 y BIR2 para inhibir a las caspasas 3 y 7, y mediante el dominio BIR3 se une para bloquear la caspasa 9. Smac/DIABLO tiene una región que es estructuralmente similar a las regiones de las caspasas 3 y 7 para mediar la unión al dominio BIR2 de XIAP, y otra región homóloga a la caspasa 9 que se une al dominio BIR3 de XIAP. Por lo tanto, Smac/DIABLO puede activar la apoptosis por unión competitiva a los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP, conduciendo la eliminación de la inhibición de las caspasas 3, 7, y 9 (Qin *et al.*, 2012).

2.5. Calpaínas

Las calpaínas pertenecen a una familia de cisteín-proteasas dependientes de calcio. Actualmente hay 14 calpaínas conocidas en humanos, que se dividen en dos clases, típicas y atípicas (Sorimachi *et al.*, 2010; Storr *et al.*, 2011). Los mejores representantes, y los más caracterizados de las calpaínas, son las isoformas típicas o clásicas μ -calpaína (también conocida como calpaína 1) y m -calpaína (calpaína 2). Los prefijos μ - y m - en los nombres comunes de estas enzimas se corresponden directamente con la concentración de calcio μ molar o milimolar necesarias para su activación “*in vitro*” (Lopatniuk and Witkowski,

2011). Ambas son heterodímeros que contienen una subunidad reguladora de 28 kDa idéntica para las dos isoformas, y una subunidad catalítica grande de 80 kDa que comparte un 55-66% de homología de secuencia entre ambas proteasas (Schad *et al.*, 2002). La subunidad grande comprende cuatro dominios (DI-DIV), mientras que la subunidad pequeña tiene dos dominios (DV y DVI) (Fig. 7):

- Dominio I: Se produce autoproteólisis de este dominio cuando las calpaínas están activadas.
- Dominio II: Contiene el sitio catalítico, que se divide en dos subdominios DIIa y DIIb.
- Dominio III: Tiene un dominio característico (C2-like) encontrado en varias proteínas y que está implicado en los cambios estructurales durante la unión con calcio (Hanna *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2008).
- Dominios IV y VI: Contienen 5 regiones EF-hand que están implicadas en la unión al calcio, el quinto EF-hand es responsable de la dimerización de las subunidades (Blanchard *et al.*, 1997; Imajoh *et al.*, 1987).
- Dominio V: contiene una cadena de residuos de glicina en el región N-terminal de la unidad reguladora, que pueden permitir la interacción con la membrana plasmática y que se autoproteóliza durante la activación de las calpaínas (Imajoh *et al.*, 1986).

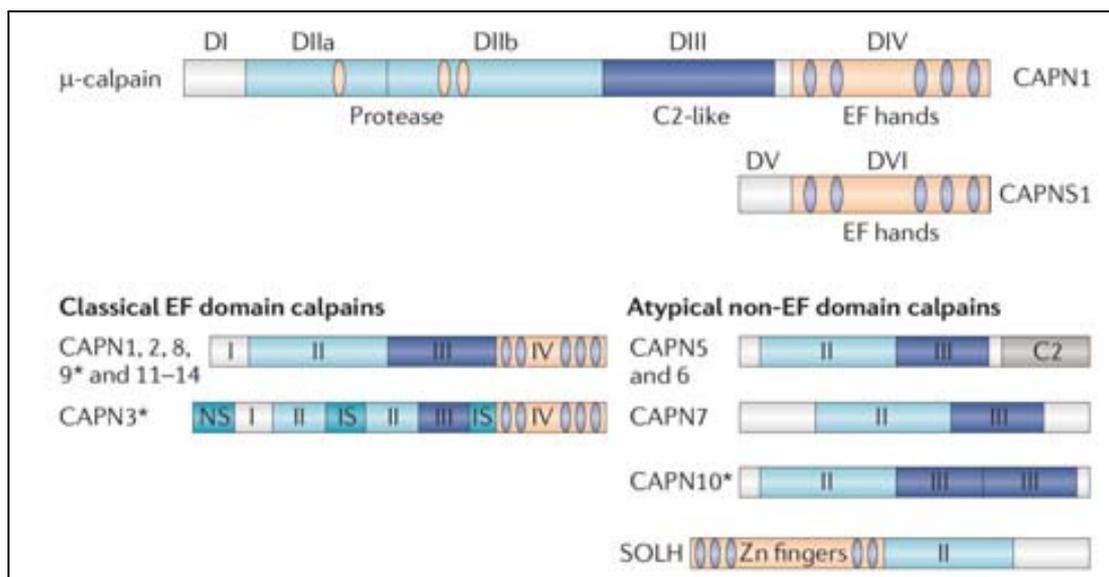


Figura 7. Esquema representativo de la estructura del heterodímero de μ -calpaína y de los miembros de la familia de calpaínas: (Storr *et al.*, 2011)

El dominio DII es similar entre las calpaínas, mientras que existe divergencia entre otros dominios dentro de las isoformas (Sorimachi *et al.*, 2010; Storr *et al.*, 2011).

La actividad de las calpaínas está controlada por su inhibidor endógeno natural, la calpastatina, que es una proteína intrínsecamente no estructurada capaz de la unión reversible y la inhibición de cuatro moléculas de calpaína, pero sólo en presencia de calcio (Hanna *et al.*, 2007; Wendt *et al.*, 2004).

Las calpaínas están implicadas en la proteólisis controlada de numerosas proteínas celulares (más de 100), y se cree que tienen un papel importante en diversos fenómenos biológicos, desde la proliferación y la diferenciación, hasta el envejecimiento y la muerte (Hanna *et al.*, 2008; Lopatniuk *et al.*, 2011). Se piensa que las calpaínas pueden tener un papel relevante en la regulación del desarrollo de los tumores y la apoptosis en ciertas neoplasias humanas comunes como la del pulmón, mama, próstata y otros cánceres (Braun *et al.*, 1999; Mamoune *et al.*, 2003). La actividad calpaína está vinculada con la migración celular a través de la proteólisis de las proteínas de adhesión focal, como la quinasa de adhesión focal y la talina (Beckerle *et al.*, 1987).

Los sustratos de calpaína comprenden varios enzimas, como la proteína quinasa C (PKC) y PARP, varios transductores de señal y factores de transcripción (c-jun, NFkB), y proteínas del citoesqueleto como la fodrina (Saido *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 2004).

Las caspasas y las calpaínas comparten diferentes sustratos (fodrina α , PARP, CaMKIV). Algunas caspasas son sustratos de calpaínas y la calpastatina puede ser sustrato de caspasas, lo que complica sus posibles interacciones (Wang, 2000). La caspasa-3 es capaz de degradar la calpastatina facilitando la activación de las calpaínas, que a su vez promueven la proteólisis de las caspasas creando un "feedback loop" positivo entre caspasas y calpaínas (Kato *et al.*, 2000; Mikosik *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1998a). Se ha descrito que las caspasas 7, 9, 10 y 12 son sustratos de calpaínas. Las caspasas 10 y 7 se activan por la proteólisis mediada por calpaínas, mientras que la caspasa-9 se inhibe (Chua *et al.*, 2000; Gafni *et al.*, 2009). Durante el estrés del retículo endoplasmático, las calpaínas pueden activar la caspasa-12, dando lugar a la apoptosis (Martínez *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que la caspasa-8 puede activar la m-calpaína mediante proteólisis de la calpastatina, para promover la migración de células tumorales (Barbero *et al.*, 2009).

Las calpaínas pueden facilitar la apoptosis a través de la proteólisis de diversos miembros de la familia Bcl-2. Se ha mostrado que las calpaínas activas pueden cortar a Bax en su extremo N-terminal (en Asp33), generando un fragmento pro-apoptótico potente de 18 kDa

(Bax/p18), incapaz de interactuar con los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 o Bcl-x_L, que puede translocar a la mitocondria y promover la salida de citocromo c (Gao and Dou, 2000; Toyota *et al.*, 2003). La proteólisis de Bid por calpaínas conduce a la permeabilización mitocondrial y la apoptosis tras la isquemia miocárdica/reperfusión (Mandic *et al.*, 2002). Además, la calpaína mitocondrial está implicada en la proteólisis del factor inductor de apoptosis (AIF) generando tAIF, que se libera a través de los poros mitocondriales inducidos por Bid o Bax (Liu *et al.*, 2009; Polster *et al.*, 2005).

2.6. Factor inductor de apoptosis (AIF)

El factor inductor de apoptosis (AIF) representa la primera proteína mitocondrial que se ha visto que está implicada en mediar la muerte celular independiente de caspasas (Susin *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 1996). AIF es una proteína esencial para la vida debido a su papel crítico como oxidoreductasa mitocondrial, pero puede participar en procesos de muerte celular debido a su actividad pro-apoptótica nuclear.

AIF se sintetiza a partir de un gen nuclear que se transcribe y se traduce en una proteína de 613 aminoácidos como una forma precursora de 67 kDa, que lleva una secuencia de localización mitocondrial (MLS) en el dominio N-terminal (Loeffler *et al.*, 2001). Al ser importada a la mitocondria, la MLS se elimina mediante un endopeptidasa mitocondrial generando la forma madura de la proteína de 62 kDa. En esta configuración, AIF es anclada a la membrana interna cuya parte N-terminal está expuesta a la matriz mitocondrial y cuya porción C-terminal está expuesta al espacio intermembrana mitocondrial (Otera *et al.*, 2005). La forma madura de AIF se compone de tres dominios estructurales: un dominio de unión a FAD, un dominio de unión a NADH, y un dominio C-terminal (Mate *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2002). Por otra parte, la reducción de AIF puede catalizar la reducción dependiente de NADH de pequeñas moléculas, tales como citocromo c (Miramar *et al.*, 2001). De esta forma, AIF desempeña una función vital relacionada con la estabilidad de la cadena respiratoria y/o el mantenimiento de la estructura mitocondrial (Fig. 8).

Diversos tipos de estrés pueden hacer que AIF se libere de su anclaje a la membrana mitocondrial mediante la activación de las calpaínas (mitocondriales o citosólicas) o las catepsinas, dando lugar a una proteína soluble (tAIF) de 57 kDa (Delavallee *et al.*, 2011; Norberg *et al.*, 2010). Diferentes proteínas, tales como Bax y Bid, miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, regulan la liberación de tAIF a través de la formación de

poros en la membrana mitocondrial externa (Landshamer et al., 2008; Moubarak et al., 2007; Tobaben et al., 2011). Una vez en el citosol, tAIF interactúa con diferentes dianas (Fig.8), y luego se traslada al núcleo donde induce la cromatinólisis. Esta relocalización se regula positivamente por la ciclofilina A (CypA), mientras que se regula negativamente por la proteína Hsp70. Una vez en el núcleo, tAIF se asocia con la histona H2AX, CypA, o la endonucleasa G (EndoG) para provocar la condensación de la cromatina y la degradación del DNA (Delavallee *et al.*, 2011; Joza *et al.*, 2009).

Cuando los polímeros PAR generados por la proteína nuclear PARP-1 están presentes, AIF se libera de las mitocondrias y alcanza el núcleo para provocar la condensación de cromatina en un mecanismo independiente de la activación por calpaínas (Wang *et al.*, 2009).

Se ha calculado que alrededor del 30% de AIF está libremente asociada con la membrana mitocondrial externa en el lado citosólico, además de su principal localización en el espacio intermembrana mitocondrial unida a la membrana interna (Yu et al., 2009). Esta localización de AIF puede permitir su liberación rápida al citosol, antes incluso que su liberación desde la mitocondria cuando el programa de muerte celular ya es irreversible.

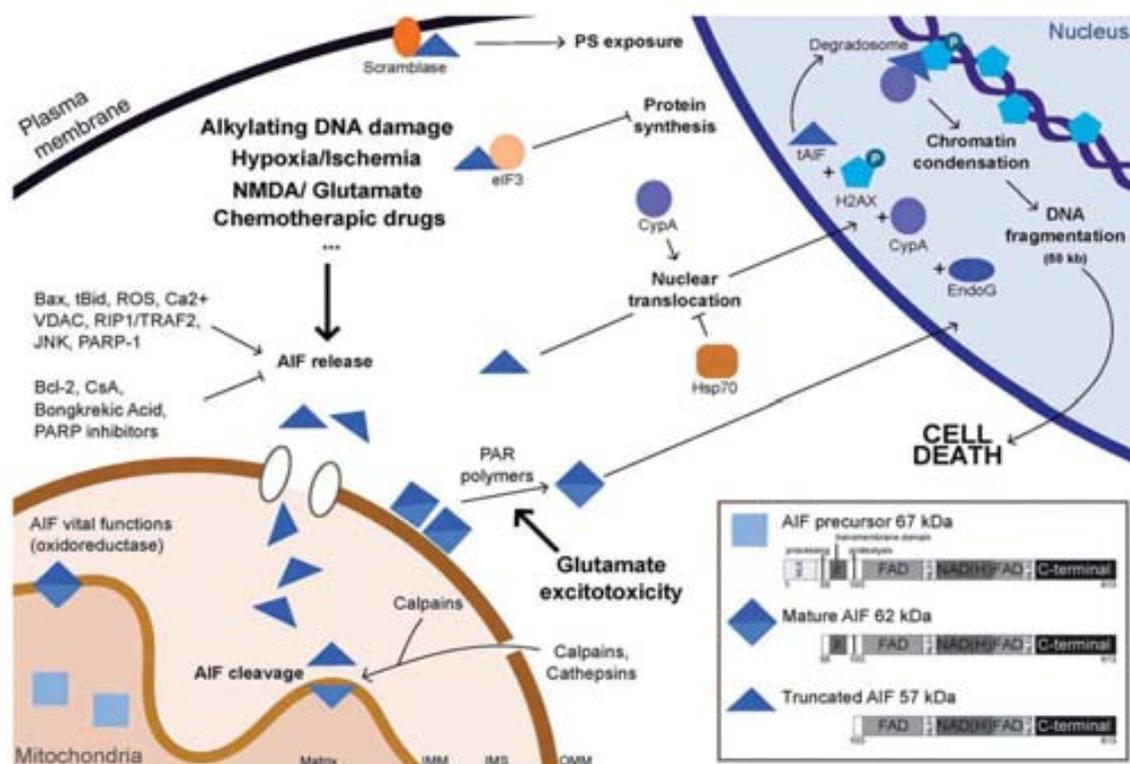


Figura 8. Esquema representativo de la estructura de AIF y la vía de apoptosis independiente de caspasas inducida por AIF: (Delavallee *et al.*, 2011)

3. La vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de serin-treonin quinasas citosólicas, que se caracterizan por transformar señales de numerosos estímulos extracelulares, tales como factores de crecimiento, citoquinas, y distintos tipos de estrés (como el shock hiperosmótico), en una amplia gama de respuestas celulares: proliferación, diferenciación, y muerte (Keshet and Seger, 2010).

Las MAPKs forman parte de una cascada de proteínas quinasas que es iniciada por señales extracelulares específicas y conduce a la activación de una MAPK particular, después de la activación sucesiva de una MAPK quinasa quinasa (MAP3K) y una MAPK quinasa (MAP2K) (Fig. 9). La MAP3K se activa normalmente por la interacción con una GTPasa pequeña y/o la fosforilación por proteínas quinasas de los receptores de la superficie celular (Cuevas *et al.*, 2007). La MAP3K fosforila y activa directamente una MAP2K, la cual, a su vez, activa una MAPK por una fosforilación dual de un dominio de tres aminoácidos conservado Thr-X-Tyr en el segmento de activación (donde X es glutamato, prolina o glicina para las quinasas ERK, JNK y p38 respectivamente). Una vez activadas, las MAPKs fosforilan residuos de serina y treonina seguidos por una prolina de diversos sustratos citosólicos y nucleares, que incluyen otras proteínas quinasas e importantes factores de transcripción, para generar cambios en la función de las proteínas y la expresión génica que ejecutan la respuesta biológica adecuada (Zhang et al., 2008).

Las MAP quinasas se pueden agrupar en tres grandes familias en mamíferos. Una de estas familias agrupa a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), que se activan por una gama de estímulos que incluyen factores de crecimiento, factores mitogénicos, citoquinas y agentes transformantes y carcinógenos, y que están implicadas en la proliferación celular y en procesos de diferenciación (McKay and Morrison, 2007; Shaul and Seger, 2007). Las otras dos familias de MAPKs, que se llaman también proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs), corresponden a las quinasas p38 y JNK (c-jun N-terminal kinase) que se activan por diversos tipos de estrés ambiental tal como la radiación UV y el shock osmótico, y distintos tipos de citoquinas preinflamatorias, y que tienen un papel clave en la inflamación, así como en la homeostasis del tejido, ya que controlan la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Nebreda and Porras, 2000; Rincon and Davis, 2009).

La actividad de las MAPKs se regula por las fosfatasa genéricas y las fosfatasa de especificidad dual, además de las proteínas "scaffold", que son generalmente específicas para cada una de las tres vías principales de MAPK de mamíferos (Morrison and Davis, 2003; Wagner and Nebreda, 2009).

Se ha descrito un papel para p38 y JNK en la progresión del ciclo celular en varios organismos (Ambrosino and Nebreda, 2001; Pearce and Humphrey, 2001). JNK y p38 regulan la progresión del ciclo celular en diferentes puntos de transición mediante mecanismos dependientes e independientes de transcripción (Wagner and Nebreda, 2009). La proteína JNK se activa en los oocitos de *Xenopus* en condiciones de estrés osmótico (Bagowski *et al.*, 2001; Martiáñez *et al.*, 2009), pero también durante la progresión meiótica (Bagowski and Ferrell, Jr., 2001; Bagowski *et al.*, 2001). Sin embargo, todavía no está claro el papel que puede tener esta activación en la maduración o en la muerte del oocito.

En levadura se han descrito toda una serie de estrategias que utilizan las proteínas quinasas activadas por estrés para regular las distintas fases del ciclo celular (Clotet and Posas, 2007). Estos autores, han sugerido que la regulación del ciclo celular es una respuesta general al estrés, esencial para la supervivencia de la célula y proponen la existencia de un nuevo "checkpoint" osmótico que modularía las transiciones del ciclo a través de la activación de las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs) y que protegería a las células de los cambios osmóticos durante cualquier fase del ciclo celular (Clotet *et al.*, 2007).

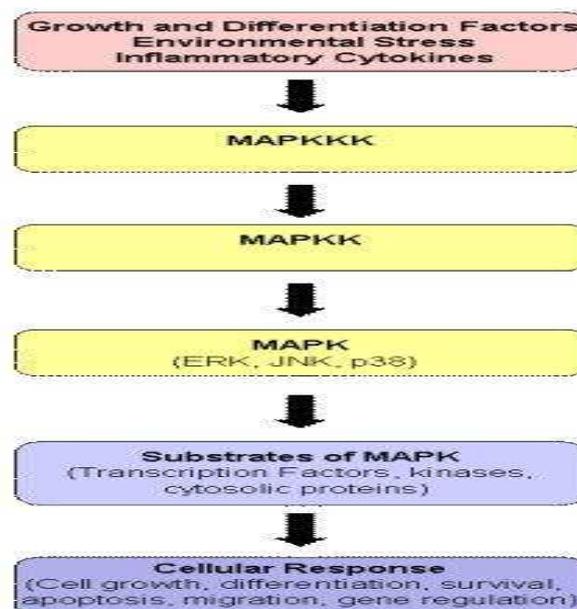


Figura 9. Esquema representativo de la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). <http://rnaidesigner.lifetechnologies.com>

3.1. La vía de p38

La familia de p38 MAPK está compuesta por 4 isoformas que poseen 60-70% de homología entre ellos. La p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (SAPK3/ERK6/MAPK12) y la p38 δ (SAPK4/MAPK13), que están codificadas por diferentes genes y que tienen diferentes patrones de expresión en los tejidos, siendo p38 α el componente mayoritario que se expresa de una forma ubicua en la mayoría de los tipos celulares, mientras que las otras isoformas se expresan de una manera específica en distintos tejidos, por ejemplo, p38 β se expresa preferentemente en el cerebro, p38 γ en el músculo esquelético y p38 δ en las glándulas endocrinas (Cuadrado and Nebreda, 2010).

Las p38 MAPKs son activadas por fosforilación dual en la secuencia de activación Thr-Gly-Tyr. En respuesta a diversos estímulos, MKK3 y MKK6 fosforilan las p38 MAPKs (Alonso *et al.*, 2000; Cuenda *et al.*, 1997; Enslen *et al.*, 1998). En algunas circunstancias, tales como la radiación ultravioleta, MKK4, un activador de JNK, puede contribuir a la activación de p38 α (Brancho *et al.*, 2003). Se ha descrito que el shock hiperosmótico activa MKK6 y MKK3 en fibroblastos embrionarios de ratón (Remy *et al.*, 2010). MKK6 puede fosforilar p38 α , p38 β y p38 γ pero no activa p38 δ en respuesta al shock hiperosmótico, mientras que MKK3 activa p38 α , p38 γ y p38 δ , pero no activa p38 β (Remy *et al.*, 2010). La autofosforilación también puede contribuir a la activación de las p38 MAPK (Cuenda and Rousseau, 2007; Mittelstadt *et al.*, 2005).

A su vez, MKK3 y MKK6 pueden ser activadas por varias MAP3Ks como ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), DLK1 (dual-leucine-zipper-bearing kinase 1), TAK1 (TGF β -activated kinase 1), TAO1 y TAO2 (thousand-and-one amino acid), TPL2 (tumour progression loci 2), MLK3 (mixed-lineage kinase 3), MEKK1-4 (MAPK/ERK kinase kinase), y ZAK1 (leucine zipper and sterile- α motif kinase 1). A su vez, estas quinasas son activadas por la familia de GTPasas Rho (Rho, Rac y Cdc42). La diversidad de los MAP3Ks y sus mecanismos de regulación proporciona la capacidad de responder a muchos estímulos diferentes y de integrar la activación de p38 MAPK con otras vías de señalización (Cuevas *et al.*, 2007).

La duración de la fosforilación de p38 parece crucial para regular el destino celular, de manera que una activación sostenida está asociada a la apoptosis (Murphy and Blenis, 2006; Tobiume *et al.*, 2001), mientras que la fosforilación transitoria está asociada a supervivencia (Roulston *et al.*, 1998). La duración de la señalización se controla mediante las fosfatasas, incluyendo la proteína fosfatasa 1, la proteína fosfatasa 2A o las MAPK

fosfatasa (MPK). Estas enzimas pueden ser activadas por las p38 MAPKs fosforiladas, creando un "feedback loop" negativo que regula fuertemente las p38 MAPKs activas (Owens and Keyse, 2007).

Estudios bioquímicos han demostrado que p38 α fosforilado en Thr180 y Tyr182 es 10-20 veces más activo que p38 α fosforilado solamente en Thr180, mientras que p38 α fosforilado solamente en Tyr182 es inactivo (Zhang *et al.*, 2008). Se piensa que la Thr180 es necesaria para la catálisis, mientras que la Tyr182 puede ser necesaria para la auto-activación y el reconocimiento de los sustratos (Askari *et al.*, 2009).

Las p38 MAPKs fosforiladas pueden activar una amplia gama de sustratos, tanto "in vivo" como "in vitro". Los sustratos de p38 comprenden: proteínas quinasas implicadas en diferentes procesos, proteínas nucleares (incluyendo factores de transcripción y reguladores de la remodelación de la cromatina), y una colección heterogénea de proteínas citosólicas que regulan procesos tan diversos como la localización y la degradación de proteínas, la estabilidad del mRNA, la endocitosis, la apoptosis, la dinámica del citoesqueleto o la migración celular (Cuadrado *et al.*, 2010).

Los sustratos de p38 comprenden:

- Proteínas quinasas implicadas en diferentes procesos, tal como MK2 (MAPK-activated kinase 2) y MK3 que participan en el control de la expresión génica. MK2 es bien conocido por desempeñar un papel importante en la remodelación de los filamentos de actina mediante la fosforilación de las proteínas de shock térmico Hsp27 en diferentes serinas (Huot *et al.*, 1997; Shi and Gaestel, 2002). Otras quinasas sustratos de p38 son MSK (mitogen-and stress-activated proteína kinase) 1 y 2, que pueden fosforilar y activar directamente factores de transcripción (CREB, ATF1) y proteínas nucleosomales como las histonas H3 y HMG-14 (high-mobility group 14), y juegan un papel importante en la inducción rápida de los genes en respuesta al estrés o a los estímulos mitogénicos, ya sea mediante la inducción de la remodelación de la cromatina o mediante el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Arthur, 2008; Soloaga *et al.*, 2003). Por último, p38 tiene como sustrato a MNK (MAP kinase-interacting serine/threonine kinase) 1 y 2, que regulan la síntesis de proteínas mediante la fosforilación del factor de iniciación eucariota 4E (eIF4E) (Mahalingam and Cooper, 2001).
- Un gran número de proteínas citosólicas pueden ser fosforiladas por p38 MAPKs, incluyendo la fosfolipasa A2, la proteína asociada al microtubulo Tau, NHE-1, la ciclina D1, inhibidores de CDK (quinasa dependiente de la ciclina), proteínas de la

familia Bcl-2, receptores de los factores de crecimiento o queratinas (Cuenda *et al.*, 2007; Ono and Han, 2000; Shi *et al.*, 2002).

- Muchos factores de transcripción son fosforilados y activados por p38 MAPKs en respuesta a diferentes estímulos, tal como ATF 1, 2 y 6 (activating transcription factor), sap1 (SRF accessory protein 1), p53, MEF2A y MEF2C (myocyte-specific enhancer factor) y C/EBP β (Cuadrado *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios se han centrado en la función de p38 α . Esta quinasa puede regular negativamente la progresión del ciclo celular en las transiciones G1/S y G2/M por varios mecanismos, incluyendo la regulación de las ciclinas y los inhibidores CDK, y la modulación de p53 (Ambrosino and Nebreda, 2001; Thornton and Rincon, 2009). La regulación negativa de la proliferación está emergiendo como una función importante y altamente conservada de p38 α en varios tipos de células primarias, incluyendo cardiomiocitos, hepatocitos, fibroblastos, células hematopoyéticas y células del pulmón (Engel *et al.*, 2005; Hui *et al.*, 2007; Ventura *et al.*, 2007).

p38 α esta implicada en la inducción de la apoptosis por muchos tipos de estrés celular. Estos efectos pueden estar mediados por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, que afectan a los receptores de muerte, las vías de supervivencia o las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Wagner and Nebreda, 2009). Se ha visto que p38 α sensibiliza los cardiomiocitos y las líneas celulares derivadas MEFs a la apoptosis inducida por diferentes estímulos a través de la regulación positiva de las proteínas pro-apoptóticas Fas y Bax y la regulación negativa de la actividad de las vías de supervivencia ERK y AKT (Porrás *et al.*, 2004a; Zuluaga *et al.*, 2007). En general, en distintos tipos celulares, p38 α induce apoptosis mientras que p38 β promueve la supervivencia (Kaiser *et al.*, 2004; Nebreda *et al.*, 2000; Nemoto *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2006).

Varios estudios también han descrito las funciones de supervivencia de p38 α , que pueden ser mediadas por la inducción de la diferenciación celular o por las señales inflamatorias anti-apoptóticas, tales como la interleucina-6 (IL-6) (Wagner and Nebreda, 2009). En células de mamífero la activación de p38 por estrés hiperosmótico inhibe la caspasa-9 mediante fosforilación de la treonina 125 (Seifert and Clarke, 2009). Además, p38 también puede mediar la supervivencia celular mediante la regulación de los programas de la autofagia (Comes *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha visto que p38 γ regula la parada en G2 inducida por la radiación γ (Wang *et al.*, 2000). En los oocitos de *Xenopus laevis* se ha descrito que la activación de p38 γ regula la transición G2/M durante la progresión meiótica

(Perdiguero *et al.*, 2003). Se ha descrito que p38 δ puede mediar la proliferación celular epidérmica inducida por TPA en los ratones (Schindler *et al.*, 2009). En los eritrocitos humanos se ha descrito que p38 participa en la apoptosis inducida por shock hiperosmótico (Gatidis *et al.*, 2011), aunque no se ha estudiado que isoforma es importante en este proceso.

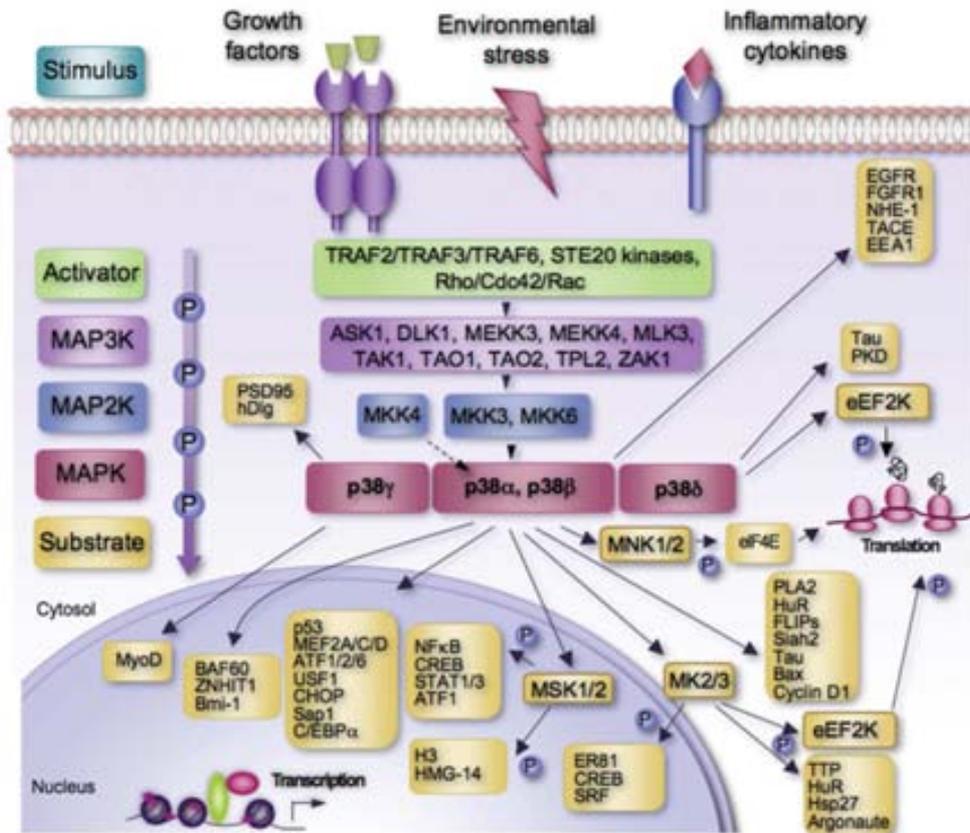


Figura 10. Esquema representativo de la vía de señalización de p38 MAPK (Cuadrado *et al.*, 2010).

3.2. La vía de JNK

La familia de JNK MAP quinasas se identificó inicialmente como proteínas que participan en la activación del factor de transcripción c-Jun fosforilando su extremo N-terminal en los residuos serina 63 y 73 (Derijard *et al.*, 1994; Hibi *et al.*, 1993), y posteriormente se identificaron como proteínas activadas por estrés (SAPKs) (Kyriakis *et al.*, 1994). La vía de JNK puede ser activada por diversos tipos de estímulos, incluyendo factores de crecimiento, shock osmótico o térmico, radiación UV, y citoquinas (como el factor de necrosis tumoral TNF α o la interleuquina IL-1).

Existen 3 isoformas de las proteínas JNK en mamíferos: JNK1, JNK2 y JNK3 (codificadas por MAPK8, MAPK9, y MAPK10, respectivamente), que presentan "splicing" alternativo dando lugar al menos a 10 isoformas posibles que aumentan la diversidad de las proteínas JNK (Gupta *et al.*, 1996), y que codifican proteínas con un tamaño de 46 o 55 kDa en mamíferos (Davis, 2000). JNK1 y JNK2 se expresan de forma ubicua en la mayoría de los tipos celulares, mientras que la proteína JNK3 se encuentra principalmente en el cerebro y en menor medida en el corazón y los testículos (Bode and Dong, 2007; Cuevas *et al.*, 2007; Kyriakis and Avruch, 2001).

Las JNKs son activadas por fosforilación dual en la secuencia de activación Thr-Pro-Tyr por MKK4 y MKK7 (también conocidas como SEK1 y SEK2, respectivamente). Mientras que MKK4 puede activar tanto JNK como p38 MAPK, MKK7 está implicada específicamente en la activación de JNK (Wang *et al.*, 2007). A su vez, MKK4 y MKK7 son activadas por fosforilación dual en dos sitios del T-loop por MAP3Ks. Se han descrito varias MAP3Ks capaces de activar la vía de señalización de JNK (Fig. 11), como son, ASK-1 (Ichijo *et al.*, 1997), MEKK1-4, MLK2 y MLK3 (Hirai *et al.*, 1997; Rana *et al.*, 1996), DLK, ZAK, DPL-2 (Salmeron *et al.*, 1996), TAK1 (Yamaguchi *et al.*, 1995), pero su papel in vivo no está claro. Parece ser que TAK1 es importante en la activación de la vía de JNK por citoquinas (Weston and Davis, 2007). También se ha comprobado que miembros de la familia MAPK fosfatasas (MKP) actúan como reguladores negativos de la señalización por JNK (Ventura *et al.*, 2006).

La diana principal de la vía de señalización de JNK es el factor de transcripción AP-1 (activador de la proteína-1), que se activa principalmente por la fosforilación de c-Jun y otras moléculas relacionadas (Gupta *et al.*, 1995). Sin embargo, JNK puede fosforilar también una gran variedad de sustratos, incluyendo proteínas nucleares como ATF-2, Elk-

1, p53 y NFAT4; y proteínas no nucleares, incluyendo varios miembros de la familia Bcl-2 como Bax, Bad, Bcl-2, y la proteína 14-3-3 (Fig. 11).

Se ha visto que JNK puede tener un papel pro- o anti-apoptótico (Davis, 2000; Weston *et al.*, 2007); aunque el mecanismo es controvertido y parece ser estímulo- y tejido-específico. Se ha comprobado que una activación transitoria de JNK produce supervivencia celular, mientras que una activación prolongada de JNK induce apoptosis (Ventura *et al.*, 2006). Una activación prolongada de JNK podría activar la vía apoptótica mitocondrial por fosforilación de varios miembros de la familia de Bcl-2, o bien por fosforilación de la proteína 14-3-3, causando la activación de las proteínas pro-apoptóticas Bak y Bax que regulan la salida de citocromo c mitocondrial (Dhanasekaran *et al.*, 2008; Weston *et al.*, 2007). JNK también induce la proteólisis de Bid independientemente de la activación de caspasa-8, dando lugar a un fragmento de 21 KDa (jBid) que se transloca a la mitocondria provocando la liberación de la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO, aunque el mecanismo no está claro (Deng *et al.*, 2003; Dhanasekaran *et al.*, 2008). Los oocitos de *Xenopus* tratados con progesterona durante 72 h mueren por apoptosis y se ha visto que las quinasas Cdk1 y JNK inducen la fosforilación de Bad en la Ser128 (Du *et al.*, 2011).

Se ha descrito que la activación transitoria de JNK retrasa la activación de la caspasa-9 por interacción directa con el apoptosoma (Tran *et al.*, 2007). Otro ejemplo de función anti-apoptótica de JNK es la fosforilación de Bad en la treonina 201, inhibiendo la asociación de Bad con la molécula anti-apoptótica BCL-x_L (Yu *et al.*, 2004).

El papel de la activación de JNK en el shock hiperosmótico no está muy claro. Se ha descrito que el intercambio de Na⁺/H⁺ que tiene lugar durante el shock hiperosmótico requiere Cl⁻, y que este proceso está mediado por la activación de JNK (Goss *et al.*, 2001). En los hepatocitos de rata se ha descrito que el shock hiperosmótico favorece el transporte del receptor CD95/Fas a la membrana haciendo que estas células sean más sensibles a la apoptosis inducida por Fas, y que este proceso es dependiente de JNK (Reinehr *et al.*, 2002).

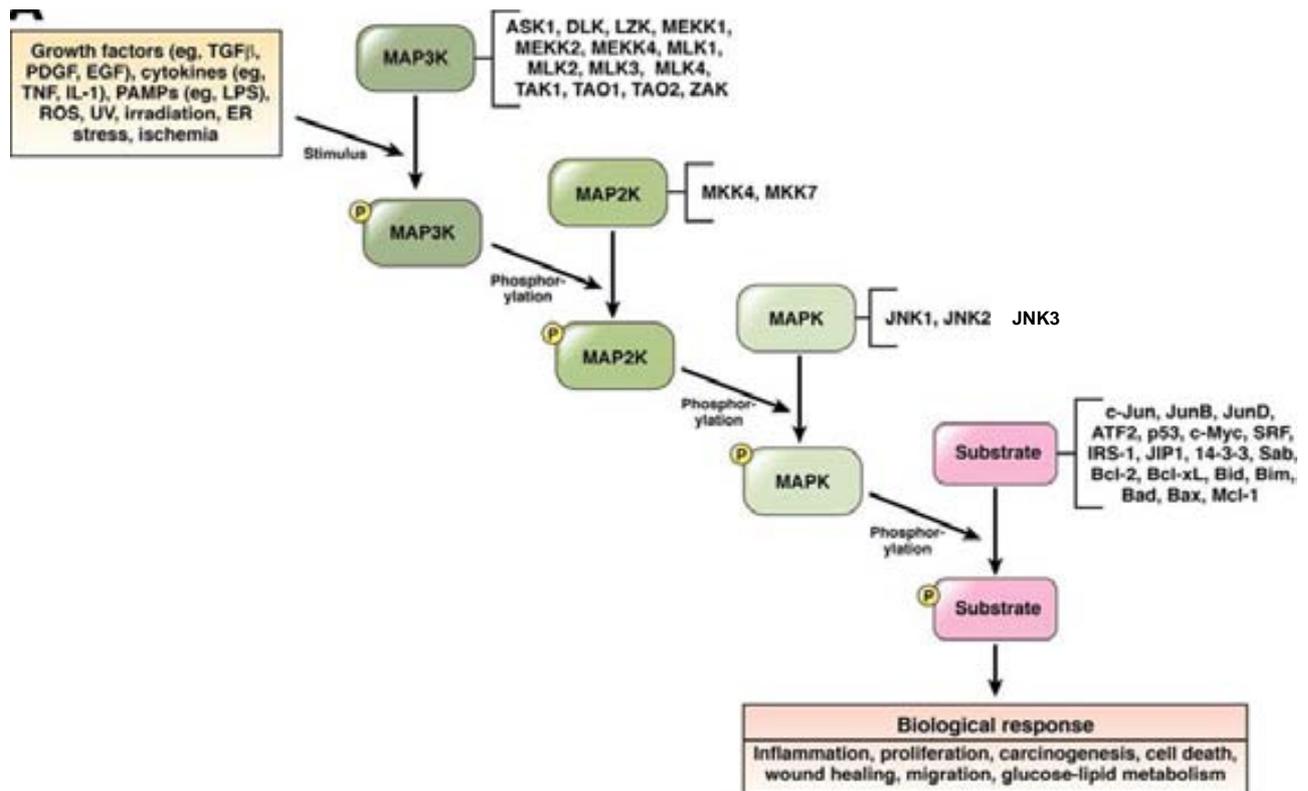


Figura 11. Esquema representativo de la vía de señalización de JNK MAPK (Seki *et al.*, 2012).

4. *Xenopus laevis* como modelo experimental

4.1. *Xenopus Laevis*

Xenopus laevis, conocida también como rana africana de uñas, es un anfibio del orden de los anuros, nativo del sudoeste de África, y que en la segunda mitad del siglo XX fue exportado a otros continentes, en principio para ser usada en pruebas de laboratorio y posteriormente para ser vendido como mascota. Su nombre proviene de las tres uñas de las patas traseras, cuya función es remover el fango para ocultarse de los depredadores y que también sirven para desgarrar tejidos de cadáveres. Las hembras son más grandes que los machos, y se caracterizan por un cuerpo aplanado. Es una especie acuática que se localiza en zonas de agua estancada cálida y rodeada de pastos así como también en riachuelos de zonas áridas y semiáridas. Es el anfibio experimental más usado en la mayoría de los laboratorios. La hembra adulta de *Xenopus laevis* produce miles de oocitos en distintos estadios de desarrollo desde el estadio I hasta el estadio VI, que son almacenados en los

lóbulos ováricos de la rana (Fig. 12). Los oocitos de *Xenopus laevis* de estadio VI, de 1 a 1,3 mm de diámetro, son lo suficientemente grandes como para permitir un estudio más fácil y detallado que en células de menor tamaño. Los oocitos se obtienen por cirugía ovárica en condiciones estériles (ver Material y Métodos apartado 1). Los oocitos de *Xenopus* (estadio VI) están parados en la profase (G2/M) de la meiosis I. La hormona progesterona rompe esta parada, reanuda el ciclo celular meiótico y convierte al oocito inmaduro en un huevo maduro y fertilizable, dando lugar a la aparición del "white spot" en el polo animal del oocito. Los oocitos de *Xenopus* se utilizan para microinyector mRNAs y expresar proteínas para estudiar su funcionalidad (por ejemplo: receptores de membrana), para estudiar mecanismos de progresión meiótica y mecanismos de apoptosis.

A)



B)

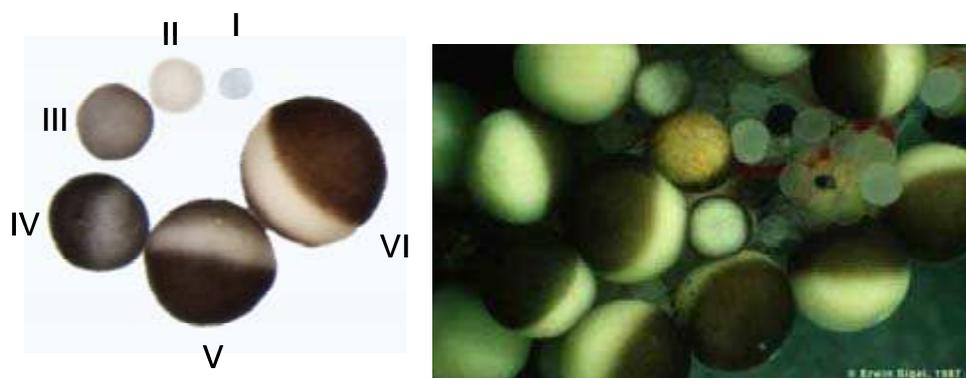


Fig.12 Oocitos de *Xenopus laevis*. (A) Los lóbulos están formados por oocitos rodeados de tejido conectivo altamente irrigado (gran cantidad de vasos sanguíneos). (B) Oocitos en distintos estadios de desarrollo. Fotos superior e inferior derecha de Erwin Siger, 1987.

4.2. Ventajas de utilizar el modelo de oocitos de *Xenopus laevis* para estudiar la apoptosis

Consideramos que el modelo de oocitos de *Xenopus laevis* es adecuado para estudiar mecanismos de muerte celular por las siguientes razones:

- Los oocitos son equivalentes a los cultivos celulares primarios, y por lo tanto los resultados obtenidos son más cercanos a la situación “*in vivo*”. Estas células disponen de toda la maquinaria necesaria para iniciar la vía mitocondrial de apoptosis. (Braun *et al.*, 2003; Coll *et al.*, 2007; Nutt *et al.*, 2005). Además, el sistema libre de células “*in vitro*” basado en extractos de huevos de *Xenopus laevis* permite identificar con detalle los factores implicados en la apoptosis. De hecho, los experimentos pioneros que describieron la vía apoptótica mitocondrial y el papel del citocromo c en la activación de caspasas se realizaron en este sistema (Kluck *et al.*, 1997; Newmeyer *et al.*, 1994).
- Los oocitos de *Xenopus laevis* permiten una mayor manipulación que otros sistemas, ya que es posible microinyectar mRNAs (para expresar constitutivos activos o dominantes negativos de las proteínas quinasas que estudiaremos), anticuerpos o oligonucleótidos antisense (para bloquear una determinada proteína), así como inhibidores o activadores que no atraviesan fácilmente la membrana plasmática.
- Es posible trabajar con células individuales para estudiar las respuestas analógica o digital de una determinada vía de señalización, como es el caso de JNK y AMPK (Bagowski and Ferrell, Jr., 2001; Martiáñez *et al.*, 2009).
- Los oocitos de *Xenopus laevis* de estadio VI están detenidos en la fase G2/M del ciclo celular y no tienen actividad transcripcional. Por lo tanto todos los mecanismos de muerte celular que ocurren en los oocitos deben ser no genómicos, debidos a la regulación traduccional o postraduccional, incluyendo la activación de vías de señalización. Esto reduce las variables a tener en cuenta al estudiar los mecanismos de apoptosis.

IV) OBJETIVOS

- Estudiar las propiedades básicas de la vía de señalización de p38 en respuesta al shock hiperosmótico.

- Estudiar el papel regulador de las vías de señalización de p38 y JNK en la apoptosis inducida por shock hiperosmótico.

- Estudiar el papel de Smac/DIABLO y las calpainas en la apoptosis inducida por shock hiperosmótico.

V) MATERIAL Y **MÉTODOS**

1. Aislamiento de los oocitos de *Xenopus laevis*

Hembras sexualmente maduras de la especie *Xenopus laevis* (compradas en el "Centre d'Elevage de Xenopus", Montpellier, France y en la compañía "Xenopus Express" Lyon, France), se mantuvieron en acuarios con agua de clorada a temperatura óptima (16-19 °C) y con periodos alternos de luz y oscuridad de 12 h. Se alimentaron tres veces por semana con una combinación de pienso y tenebrios.

Para la extracción de oocitos, las ranas se anestesiaron con 0.02% de benzocaína (Sive *et al.*, 2000). A continuación, y en condiciones de asepsia, se les extrajo porciones del ovario mediante una pequeña incisión en el abdomen de aproximadamente 1 cm. Tras finalizar la operación, se suturó la herida y el animal fue devuelto a un tanque separado hasta que se despertaba completamente de la anestesia. El mismo animal podía volverse a utilizar como donador, en perfectas condiciones, al cabo de varias semanas. El tejido ovárico extraído se colocó en una placa de petri que contenía una solución MBS (5 mM HEPES, 88 mM NaCl, 1 mM de KCl, 1 mM MgSO₄ • 7H₂O, 2.5 mM de NaHCO₃, 0.7 mM de CaCl₂, pH 7.8) y se diseccionó en trozos pequeños con unas pinzas finas de relojero. Los oocitos se separaron enzimáticamente del resto de las capas de células foliculares mediante incubación con una solución de proteasas compuesta por 0.8 mg/ml colagenasa tipo IA (Sigma, Cat N° C9891) y 0.48 mg/ml dispasa tipo II (Roche, Cat N° 165859) disueltos en la solución MBS con una suave agitación durante 2-3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los oocitos se lavaron varias veces por decantación con la solución MBS y se dispersaron en una placa de petri para su selección. Los oocitos de estadio VI (1 – 1.3 mm diámetro) se separaron manualmente con la ayuda de una lupa de binocular (Nikon) y se incubaron durante toda la noche a 18 °C en la solución MBS suplementada con 0.1 mg/ml Gentamicina (Sigma, Cat N° G1397) y 0.05 mg/ml Tetraciclina (Sigma, Cat N° T7660) para limitar el crecimiento de bacterias (Elsner *et al.*, 2000).

Al día siguiente, se seleccionaron los oocitos que se hallaban en buenas condiciones, sin alteraciones morfológicas, y se mantuvieron en una nueva placa de petri que contenía la solución MBS estéril con antibióticos. Los oocitos seleccionados fueron tratados con distintos inhibidores a las concentraciones y tiempos indicados o inyectados con mRNAs, anticuerpos o inhibidores como se describe a continuación.

2. Microinyección de los oocitos

Se utilizó el sistema de inyección automatizado "Nanoject II Automatic Nanoliter Injector" (Drummond Scientific Company) que se completa con una lupa binocular (Nikon). Para la inyección se utilizaron capilares de vidrio específicos para el microinyector convertidos en micropipetas por la acción de un estirador. Las micropipetas se llenaron de aceite mineral y se colocaron en el inyector Nanoliter, el cual se encontraba montado en un micromanipulador, se les hizo un corte oblicuo en la punta con ayuda de unas pinzas de relojero y se expulsó la mitad del aceite mediante el inyector. A continuación, se cargaron 5-10 μ l de mRNA en una punta de pipeta y se traspasaron a la micropipeta mediante aspiración con el inyector. Se transfirieron los oocitos de estadio VI previamente seleccionados a una placa de petri, la cual contenía adherida dos reglas separadas por un canal que permitía colocar los oocitos en una fila. Observando con la lupa, se inyectaron los oocitos con 50 nl (equivalente a 5 ng en el caso de mRNA) en la banda ecuatorial, evitando así inyectar en el núcleo de la célula localizado en el polo animal. En algunos experimentos se inyectaron inhibidores a distintas concentraciones. Como controles, algunos oocitos no se inyectaron o bien se inyectaron con 50 nl de H₂O ultra pura (Sigma). Los oocitos inyectados se mantuvieron 16 h en solución MBS suplementada con antibióticos a 18 °C para dar tiempo a la traducción de los mRNAs. En los experimentos de inyección de citocromo c o del anticuerpo Smac/DIABLO se incubaron los oocitos durante 2 h a 18 °C.

Una vez pasado el tiempo de incubación se recogieron muestras de 20 oocitos antes y después del shock osmótico con sorbitol durante los tiempos indicados, se lisaron y se analizaron por Western blot y se determinó la actividad caspasa, como se describe a continuación.

3. Shock hiperosmótico con sorbitol

El sorbitol se preparó disuelto en el medio MBS a las diferentes concentraciones de uso. Para realizar el shock osmótico se incubaron los oocitos con el sorbitol durante los tiempos indicados. En algunos experimentos, después del shock osmótico, los oocitos se lavaron varias veces en medio MBS y se mantuvieron sin sorbitol. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se lisaron como se describe a continuación.

4. Lisis de oocitos

Los oocitos se lisaron en el tampón de lisis (0.25 M sacarosa, 0.1 M NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7.2) que contenía inhibidores de proteasas (10 µg/ml de leupeptina, 1 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina) e inhibidores de fosfatasas (50 mM β-glicerofosfato, 50 mM fluoruro sódico, 1 mM ortovanadato sódico, 5 mM pirofosfato sódico). Se homogenizaron rápidamente con una pipeta p200 (pipeteando arriba y abajo) en 200 µl de tampón de lisis (pools de 20 oocitos) o en 16 µl de tampón de lisis (oocitos individuales). A continuación, se centrifugaron las muestras a 14.500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, recogiendo el sobrenadante (fracción citosólica) y descartando el pellet (membranas, mitocondrias y restos celulares). El sobrenadante se guardó a -20 °C.

5. Fraccionamiento subcelular

Para el fraccionamiento subcelular, se lisaron 30 oocitos en el tampón de lisis previamente descrito, y se procedió a su fraccionamiento centrifugando primero a 1.000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los lípidos y vitelos del oocito. A continuación se centrifugó el sobrenadante obtenido a 16.000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante (fracción citosólica) se guardó a -20 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 50 µl de tampón de lisis y se consideró como fracción mitocondrial, que se guardó a -20 °C (Brun *et al.*, 1981; Du *et al.*, 2011).

6. Ensayos de actividad caspasa-3

La actividad caspasa-3 se determinó utilizando el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC de la casa comercial 'Peptide Institute, Inc'. La caspasa-3 activa hidroliza el sustrato, liberándose una molécula fluorogénica (AMC) que se correlaciona con la actividad caspasa-3 y puede ser cuantificada en un lector de fluorescencia.

La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos opaca (para evitar la pérdida de fluorescencia) a la que se añadió 25 µl de fracción citosólica (corresponde a 2.5 oocitos), 25 µl de tampón de lisis y 50 µl de una mezcla que contenía 20 µl de sustrato Ac-DEVD-AMC (10 mM) y 980 µl de tampón 1x (20 mM HEPES pH 7.5, 10% glycerol y 2 mM DTT).

La placa se incubó durante 1 h a 37 °C en una estufa. Finalmente, se realizó la lectura de la fluorescencia en el lector de placas Sinergy® (BioTek), utilizando una longitud de onda de excitación/emisión de 360/460 nm.

La actividad enzimática se expresó como unidades arbitrarias de actividad caspasa-3, tomando como valor 1 los oocitos sin tratar o inyectados con H₂O.

7. Ensayos con los inhibidores

Se han utilizado inhibidores comerciales que se detallan en la tabla 1. Todos los stocks de los inhibidores se diluyen en DMSO.

<u>Inhibidor</u>	<u>Casa comercial</u>	<u>Diana</u>	<u>Stock</u>	<u>Concentración final</u>
SB203580	Calbiochem	Isoformas α y β de p38 MAPK	10 mM	100 μ M
SP600125	Calbiochem	JNK MAPK	50 mM	100 μ M
BIRB796	Axon Medchem	Todas las isoformas de p38 MAPK	95 mM	100 μ M
Z-DEVD-fmk	Calbiochem	Caspasa-3	50 mM	50 μ M
Ac-DEVD-CHO	Molecular Probes	Caspasa-3	1 mM	100 nM (dentro del oocito)
Z-VAD-fmk	Bachem	Inhibidor general de caspasas	50 mM	100 μ M
Z-VDVAD-fmk	Bachem	Caspasa-2	100 mM	100 μ M
ALLN	Calbiochem	Calpainas	25 mM	100 μ M
MDL 28170	Sigma	Calpainas	50 mM	100 μ M
CA074	Calbiochem	Cathepsina B	10 mM	50 μ M
NSIT-CHO	Calbiochem	Cathepsina L	10 mM	50 μ M

Tabla 1. Inhibidores comerciales usados.

Se pre-incubaron los oocitos durante 2 h con el inhibidor correspondiente disuelto en el medio MBS a la concentración final descrita. A continuación se incubaron los oocitos con sorbitol (300 mM) durante los tiempos indicados, con los inhibidores disueltos a la misma concentración.

Se utilizó una concentración alta de los inhibidores en comparación con las células de mamíferos debido a las propiedades específicas de los oocitos de *Xenopus* (presencia de membrana vitelina y yema) que reducen la concentración real de fármacos en la célula. En general, los valores de IC₅₀ para distintos fármacos en los oocitos de *Xenopus* son aproximadamente 10- a 20- veces superiores a las células de mamíferos (Thomas *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2001).

8. Western Blot

Es una técnica inmunoenzimática que se utiliza para la detección de proteínas. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en función del tamaño mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes y una detección posterior con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea detectar. Permite determinar el contenido relativo de proteínas presente en diferentes muestras.

El método consta de distintas fases:

8.1. Separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

El SDS (sodium dodecyl sulfate) es un compuesto orgánico que actúa como agente desnaturizante de proteínas al provocar la ruptura de los enlaces no covalentes que mantienen la estructura de las mismas, de modo que pierden su conformación nativa. Además les proporciona carga negativa, de modo que al aplicar un campo eléctrico se pueden separar las proteínas en geles de poliacrilamida en función de su tamaño.

Protocolo:

1. Montar los cristales del aparato Miniprotean II de Bio-Rad.
2. Preparar los geles de poliacrilamida (tabla 2).
3. Montar el gel en la cubeta de electroforesis, cubrir con el tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS).
4. Preparar las muestras de proteína diluidas en el tampón de carga 5x (50 mM Tris HCl, pH 6.8, SDS 2%, 100 mM dithiothreitol, 10% glicerol), calentar a 100 °C durante 5 min y cargar en el gel.
5. Correr las muestras a voltaje constante (150 V), hasta que sale el frente (azul de bromofenol).
6. Desmontar el gel.

Gel separador:

Soluciones stock	Concentraciones finales de acrilamida en el gel separador (%)					
	5	7	10	12	15	17
40% Acrylamide/Bis (ml)	2.5	3.5	5	6	7.5	8.5
4X Tris/SDS pH 8.8 (ml)	5	5	5	5	5	5
H ₂ O (ml)	12.5	11.5	10	9	7.5	6.5
PSA (μl)	75	75	75	75	75	75
TEMED (μl)	25	25	25	25	25	25

Gel concentrador:

40% Acrylamide/Bis	0.75 ml
4X Tris/SDS pH 6.8	2.5 ml
H ₂ O	6.75 ml
PSA	40 μl
TEMED	10 μl

Tabla 2. Volúmenes necesarios para la preparación de 2 geles de poliacrilamida-SDS.

8.2. Transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF

Protocolo:

1. Después de la electroforesis los geles se equilibran con el tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol).
2. Activar la membrana durante 2 min con metanol.
3. Lavar la membrana con H₂O.
4. Equilibrar la membrana con el tampón de transferencia durante 10 min.
5. Montar la transferencia siguiendo las instrucciones del aparato y transferir a 400 mA durante 120 min.
6. Desmontar la transferencia.

8.3. Incubación de la membrana con proteínas inespecíficas para bloquear los sitios de unión de anticuerpos a la membrana

Bloquear la membrana 1h a temperatura ambiente con 5% de leche desnatada en polvo en el tampón TBS-T (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl y 0.1% Tween-20).

8.4. Adición de un anticuerpo primario contra las proteínas que se quieren detectar

1. Incubar la membrana overnight (o/n) a 4 °C con el anticuerpo elegido diluido en TBS-T con BSA al 5% (tabla 3).

2. Lavar la membrana con TBS-T durante 10 minutos. Repetir 3 veces.

8.5. Adición de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, que reconoce al anticuerpo primario

Diluido 1:3000 en TBS-T con leche al 5%. Se utiliza anti-Rabbit peroxidasa (Cultek, Ref 31460) o bien anti-Mouse peroxidasa (Bio-Rad, Ref P0260) dependiendo del anticuerpo primario (tabla 3).

- Lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 minutos.

8.6. Revelado

Revelar mediante el sistema de detección ECL siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anticuerpo primario	Casa comercial (Nº Referencia)	Dilución	Anticuerpo secundario	PM (kDa)
p38	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (Ref: sc-7149)	1:200	Anti-Rabbit	38
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	CELL SIGNALING (Ref: 9211)	1:1000	Anti-Rabbit	38
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	CELL SIGNALING Ref: 9661	1:1000	Anti-Rabbit	17-19
AMPK-α	CELL SIGNALING (Ref: 25329)	1:1000	Anti-Rabbit	62
Phospho-AMPKα (Thr172)	CELL SIGNALING (Ref: 2531)	1:1000	Anti-Rabbit	62
SAPK/JNK	CELL SIGNALING (Ref: 9252)	1:1000	Anti-Rabbit	42-49
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	CELL SIGNALING (Ref: 9251)	1:1000	Anti-Rabbit	42-49
Smac/DIABLO	ProSci INCORPORATED (Ref: 2409)	1:1000	Anti-Rabbit	25
Anti-Cytochrome C	BD Pharmingen (Ref: 556433)	1:1000	Anti-Mouse	15
Myc tag	Abcam (Ref: ab9106)	1:1000	Anti-Rabbit	≈ 1,2
Phospho-cPLA2	CELL SIGNALING (Ref: 28319)	1:1000	Anti-Rabbit	95
Anti-β-Actin	SIGMA-ALDRICH (Ref: A19789)	1:10000	Anti-Mouse	42

Anti-Fodrin α	Millipore (Ref: Q13813)	1:1000	Anti-Mouse	150-240
ATP-synthase α	Invitrogen (Ref: A21350)	1:2000	Anti-Mouse	60
Anti-AIF	Sigma (Ref: A7549)	1:20000	Anti-Rabbit	57- 67

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección por Western blot.

9. ``Stripping`` de membranas de PVDF

Para reutilizar las membranas previamente incubadas con uno o varios anticuerpos, se procedió a su borrado antes de incubar con un nuevo anticuerpo. Para ello, se incubó la membrana con la solución de ``Stripping`` (100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris- HCl pH 6.7) a 50 C° durante 30 min en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana varias veces con TBS-T y se bloqueó con 5% de leche desnatada en polvo en el tampón TBS-T, antes de volver a incubar con otro anticuerpo.

10. Técnicas de Biología Molecular

10.1. Extracción de RNA total de los oocitos

La extracción de RNA total a partir de oocitos de *Xenopus* se realizó siguiendo el método descrito por McGrew (McGrew *et al.*, 1989), utilizando el tampón PAS (6% ácido p-aminosalicílico (PAS), 1% SDS, 0.1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 7.6).

Se recogieron en un tubo eppendorf cinco oocitos de estadio VI, se añadió 500 μ l del tampón PAS y se homogenizaron pipeteando la solución con una p200. Después se añadió 500 μ l de fenol /cloroformo/alcohol isoamílico (25 : 24 : 1) y se agitó todo vigorosamente. Seguidamente, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se pasó a otro tubo al que se añadió un volumen de fenol /cloroformo/alcohol isoamílico. Después de agitar, se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa final se precipitó con 2.5 volumen de etanol al 100% en presencia de 0.1 volumen de acetato sódico 3M pH 5.2 durante 30 min a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C y el pellet se lavó con 500 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó otra vez a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el pellet final se resuspendió en 50 μ l de H₂O ultrapura estéril (Sigma).

Finalmente, se midió la concentración de RNA obtenido leyendo su absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro y se comprobó la calidad del RNA corriendo una muestra en un gel desnaturante de agarosa al 1% (ver apartado 10.6.3.).

10.2. RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction)

La transcripción reversa (RT) se realizó a partir de 250 ng de RNA total a una concentración de 50 ng/ μ l. En un tubo eppendorf se añadieron 5 μ l de RNA y 6 μ l del oligonucleotido oligo-dT (20 μ M), se incubó a 70 °C durante 5 min y posteriormente se dejó en hielo. Seguidamente, se añadió la mezcla que contenía 4 μ l Buffer RevertAid, 2 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l RNase inhibitor, 1 μ l H₂O y se incubó a 37 °C durante 5 min. Finalmente se añadió 1 μ l del enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, Ref EP0441) y se incubó a 42 °C durante 1 h. La reacción se inactivó subiendo la temperatura a 70 °C durante 10 min, y finalmente se dejaron las muestras a 4 °C hasta que se realizó la reacción de PCR. El producto de RT puede conservarse a -20 °C si no se va a realizar la PCR de forma inmediata.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó a partir de 3 μ l de la RT anterior, en un volumen total de 50 μ l, a los que se añadió:

- 5 μ l de Buffer 10x Pwo SuperYield PCR Buffer con Mg²⁺
- 1 μ l de dNTPs (10 mM)
- 0.5 μ l de Pwo SuperYield DNA polimerasa (Roche, Ref. 04340850001) (5U/ μ l)
- 1.25 μ l de primer sense (20 μ M)
- 1.25 μ l de primer antisense (20 μ M)
- 38 μ l H₂O

La reacción de PCR se realizó en 35 ciclos de: 1 min de desnaturación a 95 °C, 1 min de hibridación de los oligonucleótidos a sus secuencias complementarias a 60 °C y 3 min de elongación a 72 °C. Previamente, se desnaturizó a 95 °C durante 5 min y al finalizar los 35 ciclos se prolongó la elongación a 72 °C durante 7 min más.

5 μ l del producto obtenido en la PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (ver apartado 10.6.1).

10.3. Clonage de DNA

10.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se ha convertido en una técnica fundamental en la mayoría de los laboratorios de Biología Molecular. La técnica se basa en la repetición de ciclos de síntesis de DNA mediante cambios de temperatura y utilizando una DNA polimerasa termoestable y oligonucleótidos específicos que permiten amplificar *''in vitro''* secuencias diana de ácidos nucleicos. Estos oligonucleótidos, cuya secuencia viene determinada por el ácido nucleico que queremos amplificar, se diseñan para ser complementarios a los extremos de la secuencia diana.

Los primers usados se detallan en la Tabla 4.

Para la reacción de PCR se utilizó:

- 5 µl de Pwo SuperYield PCR Buffer con Mg²⁺
- 1 µl DNA molde (10 ng/µl)
- 1 µl de dNTPs (10 mM)
- 1.25 µl de primer sense (20 µM)
- 1.25 µl de primer antisense (20 µM)
- 40 µl H₂O
- 0.5 µl de Pwo SuperYield DNA polimerasa (5U/µl)

El protocolo utilizado para la amplificación es idéntico al protocolo usado para el RT-PCR (ver el apartado 10.2).

El producto de amplificación de PCR se purificó mediante el kit comercial *''Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit''* (GE Healthcare) (ver apartado 10.5.4).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio de Restricción	Tm(°C)	Orientación
MEKK1	GCGGCCATGGCGATGTCAGCGTCTCAGGATGCC	NcoI	89.5	Sense
	GCCGAATTCCTACCACGTGGTACGGAAGAC	EcoRI	77.4	Antisense
Xenopus JNK1-1	GCCCCGGCAGCAAGCAAGCGTGACAGC	NcoI	85.6	Sense
	GCCCTCGAGTTACTGCTGCACCTGTGCTAAAGG	XhoI	79.7	Antisense
Xenopus JNK1-2	GCCCCATGGCAAGAAGCAAGCGTGACAACAATTTT	NcoI	82.9	Sense
	GCCCTCGAGTCATCATCGACAGCAACCCAG	XhoI	79.7	Antisense
Xenopus MKK7	GCCCCATGGCGGCGTCTCCCTGGAGCAGAACTCT	NcoI	89.2	Sense
	GCCCTCGAGCTACCTGCCGAAAATGGCAGGTTTTG	XhoI	84.1	Antisense
Xenopus p38 β	CACCCATGGCCGGGCGCGTTGGATTCTATAAGC	NcoI	85	Sense
	GCCCTCGAGTTACTGTTCAATCTCCAAGTTATC	XhoI	72.9	Antisense
Xenopus T. p38 δ	GCCCCATGGCCTCCTCTGTAAAGTGCAAGTTTCG	NcoI	82	Sense
	GCCCTCGAGTTACGGCAATGGACAGGTTTCCTTC	XhoI	81.3	Antisense
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	—	52.2	—

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en PCR y RT-PCR.

10.3.2. Vectores

Para el clonaje de los productos de PCR y de RT-PCR se utilizó principalmente el vector pFTX5, aunque en algunas ocasiones se ha utilizado también el vector pFTX4. Estos vectores han sido amablemente cedidos por Eusebio Perdiguero (Centro de Regulación Genómica, Barcelona) y Angel R. Nebreda (Institut de Recerca Biomèdica, Barcelona). Ambos vectores se han utilizado ampliamente en experimentos con oocitos de *Xenopus laevis* (Howell and Hill, 1997; Perdiguero and Nebreda, 2004), ya que el promotor T7 permite la expresión en sistemas de transcripción in vitro, y la cola poli (A) permite niveles elevados de expresión de proteínas. La única diferencia entre ellos es que el vector pFTX5 contiene una secuencia adicional que codifica para 13 aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal de la proteína Myc, que se utiliza como etiqueta (tag) para controlar la traducción de los mRNAs inyectados.

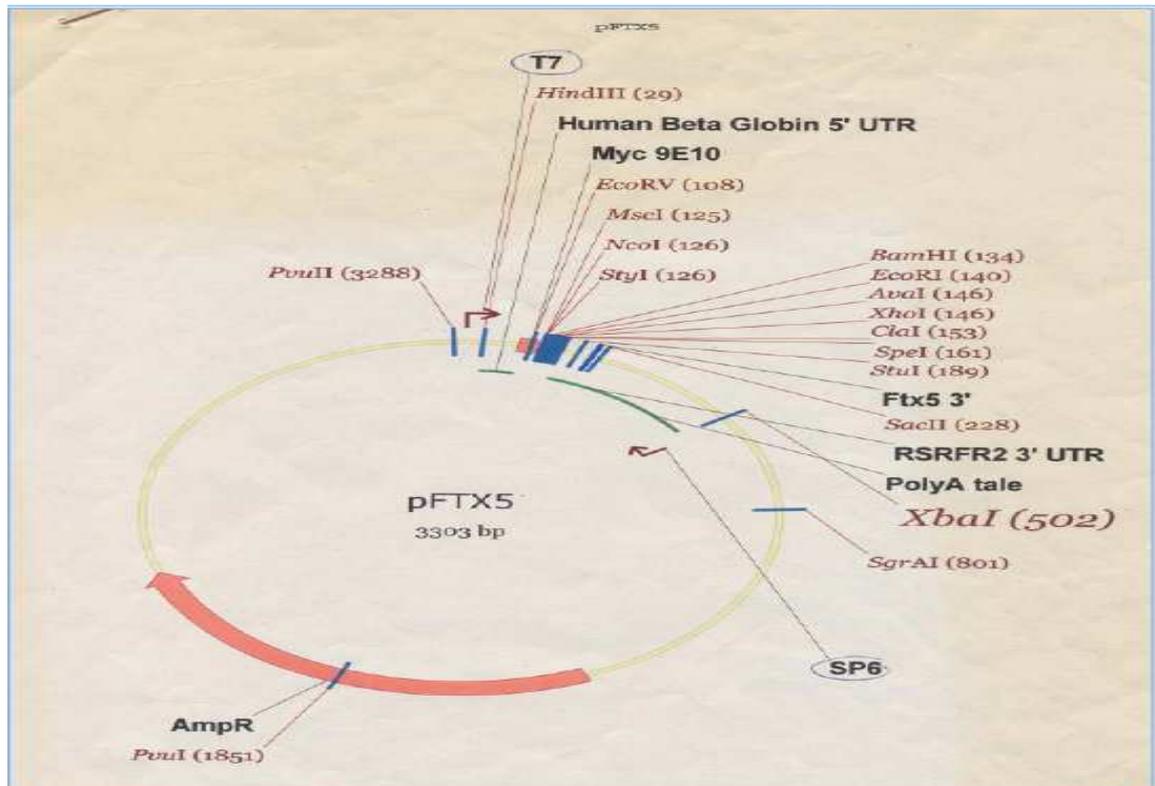


Figura 13. Mapa del vector pFTX5.

10.3.3. Digestión del DNA

Las reacciones de digestión se realizaron con enzimas de restricción de la casa comercial "Fermentas".

En dos tubos independientes se cortó en paralelo el vector y el inserto con las mismas enzimas de restricción. Se utilizaron 2 μ l de enzima (1), 2 μ l de enzima (2), x μ l de tampón tango 10x (según la compatibilidad de las 2 enzimas usados) y finalmente se añadió H₂O ultra pura hasta llegar a un volumen final de 100 μ l. Los tubos se incubaron durante 2 h a 37 °C. Los productos de digestión (inserto, plásmido linearizado) fueron purificados mediante el kit de extracción "Gel Extraction Kit de QIAGEN" (ver el apartado 10.5.3) o bien mediante el kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (ver el apartado 10.5.4).

10.3.4. Ligación entre el inserto y el vector

Una vez estimada la concentración aproximada de DNA purificado mediante electroforesis analítica (ver apartado 10.6.1.) y comparando con el marcador de DNA, se calculó la

cantidad molar del vector y del inserto a añadir en la ligación. En general se ha utilizado una relación 3:1 (inserto : vector).

Se añadió la cantidad pertinente de plásmido e inserto, 1 μ l de ligasa T4 (Invitrogen), 2 μ l de DNA ligation buffer 10x y finalmente se añadió la H₂O ultra pura hasta llegar a un volumen final de 20 μ l. Los tubos se incubaron o/n a 16 °C.

10.3.5. Transformación de bacterias competentes

Para realizar la transformación se usaron bacterias *E. Coli* DH5 α ultracompetentes preparadas según el método descrito por Inoue (Inoue *et al.*, 1990).

Tras descongelar en hielo 100 μ l de bacterias, se les añadió 10 μ l de producto de ligación y se dejaron en hielo durante 30 min. A continuación se procedió a realizar el shock térmico, incubando de las bacterias en un baño a 42 °C durante 90 seg y luego en hielo durante 5 min. Se añadió a cada tubo 800 μ l de medio Luria Broth (LB) (10 g Triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura por litro, esterilizado en autoclave) y se incubaron a 37 °C durante 45 min con agitación. Transcurrido este tiempo se sembraron 200 μ l de bacterias en una placa de petri con LB-Agar suplementado con ampicilina (50 μ g/ml).

Las bacterias se dejaron crecer o/n a 37 °C. A la mañana siguiente se aisló algunas colonias obtenidas y se crecieron en minicultivos de 5 ml de medio LB con ampicilina. Todo el proceso de transformación se realizó al mechero Bunsen para evitar contaminaciones.

El DNA plasmídico se purificó mediante el kit "GEN ELUTE™ PLASMID MINIPREP KIT" de Sigma (ver el apartado 10.5.1). La confirmación de cada clon se realizó mediante secuenciación del DNA.

10.3.6. Secuenciación del DNA

Las reacciones de secuenciación se han obtenido con el kit "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" de la casa comercial Applied Biosystems.

Para la reacción se utilizó:

- 1.5 μ l de 5x Big Dye buffer
- 1 μ l DNA molde (400 ng/ μ l)
- 1 μ l de primer (5 μ M)
- 1 μ l Big Dye
- 5.5 μ l H₂O

Los primers usados en la reacción de secuenciación se detallan en la tabla 5.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm(°C)	Orientación
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	50.8	Sense
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	42.6	Antisense
Ftx5 reverse	CCAGGGTGGATTGAGTCCAG	66.9	Antisense

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en la reacción de secuenciación.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

96 °C	6 seg	
96 °C	30 seg	} 24 ciclos
50 °C	15 seg	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

A continuación se precipitó el producto obtenido de la reacción de secuenciación, añadiendo 40 µl de una mezcla que contenía 650 µl etanol 100%, 30 µl de acetato sódico 3M pH 5.2, 130 µl de H₂O ultra pura y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el pellet se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó otra vez a 14.000 rpm durante 5 min a 4 °C y el pellet final se dejó secar a 37 °C.

Finalmente, los tubos se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona.

10.4. Mutagénesis Dirigida de DNA

Para llevar a cabo la mutagénesis en nucleótidos puntuales se procedió según el método recomendado por el sistema comercial "QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit" de Stratagene siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como DNA molde se utilizó el plásmido que contiene el DNA de interés donde se va a insertar la mutación. Los primers se diseñaron según las recomendaciones del protocolo del kit, conteniendo la mutación que se quiere introducir en el centro del oligonucleótido. Los oligonucleótidos usados se detallan en la tabla 6:

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm(°C)	Orientación	Mutación
Xenopus p38α AF	GATGAGGAAATGGCTGGATTTGTTGCTACTCGC	78.2	Sense	Mutante inactivo
	GCGAGTAGCAACAAATCCAGCCATTTCTCATC	78.2	Antisense	
Xenopus p38α K54R	GCATTGCGTATTGCTGTAAGAAAACCTCTAGGCCG	77.5	Sense	Mutante inactivo
	CGGCCTAGAGAGTTTTCTTACAGCAATACGCAATGC	77.5	Antisense	
Xenopus JNK1-1 K55R	AGACATGTTGCCATCAGAAAACCTGAGTCGGCCA	80.3	Sense	Mutante inactivo
Xenopus JNK1-2 K55R	TGGCCGACTCAGTTTTCTGATGGCAACATGTCT	80.3	Antisense	
Xenopus JNK1-1 AF	AGTTTTATGATGGCACCATTTGTAGTGACTCGT	72.6	Sense	Mutante inactivo
Xenopus JNK1-2 AF	ACGAGTCACTACAAATGGTGCCATCATAAACT	72.6	Antisense	
Xenopus p38β K52R	CAAAGGTGGCAGTAAGAAAGCTCTCCAGGCCA	79.2	Sense	Mutante inactivo
	TGGCCTGGAGAGCTTTCTTACTGCCACCTTTTG	79.2	Antisense	
Xenopus p38β AF	GATGATGAAATGGCTGGGTTTGTGCAACAAGG	79.3	Sense	Mutante inactivo
	CCTTGTGCAACAAACCCAGCCATTTCTCATC	79.3	Antisense	
Xenopus T. p38δ K54R	GAAAAGGTGCGCATAAGGAAGTTGAGTCGGCCT	78.8	Sense	Mutante inactivo
	AGGCCGACTCAACTTCCTTATGGCGACCTTTTC	78.8	Antisense	
Xenopus T. p38δ AF	GATGCAGAGATGGCTGGCTTTGTAGTGACACGC	80.4	Sense	Mutante inactivo
	GCGTGTCACTACAAAGCCAGCCATCTCTGCATC	80.4	Antisense	
Human p38δ K54R	GAGAAGGTGGCCATCAGGAAGCTGAGCCGACCC	84.5	Sense	Mutante inactivo
	GGGTCGGCTCAGTTCTGATGGCCACCTTCTC	84.5	Antisense	
Human p38δ AF	GACGCCGAGATGGCTGGCTTCGTGGTGACCCGC	89.8	Sense	Mutante inactivo
	GCGGGTCACCACGAAGCCAGCCATCTCGGCGTC	89.8	Antisense	
Xenopus p38β D176A	GCACGGCAGGCAGATGCTGAAATGACTGGGTAT	82	Sense	Constitutivo activo
	ATACCCAGTCATTTACAGCATCTGCCTGCCGTGC	82	Antisense	
Xenopus p38γ D177A	CTGGCAAGACACACAGCCAGTGAAATGACTGGT	79.7	Sense	Constitutivo activo
	ACCAGTCATTTCACTGGCTGTGTCTTGCCAG	79.7	Antisense	
Xenopus T. p38δ D176A	CTGGCACGGCATGCAGCTGCAGAGATGACTGGC	87.4	Sense	Constitutivo activo
	GCCAGTCATCTCTGCAGCTGCATGCCGTGCCAG	87.4	Antisense	
Xenopus p38α D177A	TTGGCACGGCATAACAGCTGAGGAAATGACTGGA	81.9	Sense	Constitutivo activo
	TCCAGTCATTTCTCAGCTGTATGCCGTGCCAA	81.9	Antisense	
Xenopus p38α F328S	CCTTATGATCAGAGCTCTGAGAGTCGTGAGTTG	73.9	Sense	Constitutivo activo
	CAACTCAGACTCTCAGAGCTCTGATCATAAGG	73.9	Antisense	
Xenopus MKK7 DED	GGGCGCTTGTGGACGACAAGGCAAAGGAGAGGGAT GCAGGCTGTGCTGC	94.7	Sense	Constitutivo activo
	GCAGCACAGCCTGCATCCCTCTCCTTTGCCTTGTCTGCC ACAAGGCGCCC	94.7	Antisense	
Xenopus MKK7 K146M	GGACACGTCATCGCAGTTATGCAAATGCGTCCG	82.1	Sense	Mutante inactivo
	CGACGCATTTGCATAACTGCGATGACGTGTCC	82.1	Antisense	

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la mutagénesis dirigida.

Mediante la utilización de la DNA polimerasa de alta fidelidad Pfu Turbo (Stratagene, Ref. 600250), se extienden los primers generando un plásmido nuevo de doble cadena que contiene la mutación.

En la reacción de PCR se utilizó:

- 5 μ l de 10x Cloned Pfu reaction buffer
- 1 μ l DNA molde (10 ng/ μ l)
- 1 μ l de dNTPs (10 mM)
- 0.7 μ l de primer sense (20 μ M)
- 0.7 μ l de primer antisense (20 μ M)
- 40.6 μ l H₂O
- 1 μ l de Pfu Turbo DNA polimerase (2.5 U/ μ l)

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

95 °C	30 seg	
95 °C	30 seg	} 16 ciclos
55 °C	1 min	
68 °C	5 min	
4 °C	∞	

El DNA parental fue eliminado tras añadir a la mezcla 1 μ l de la enzima de restricción Dpn I (10 U/ μ l) durante 2.5 h a 37 °C. La endonucleasa Dpn I tiene una acción específica sobre secuencias metiladas y hemimetiladas resultando así seleccionadas las copias mutantes.

El producto de PCR se transformó en cepas DH5 α de *E. coli* ultracompetentes seleccionando las colonias transformantes con la resistencia específica del vector (ampicilina, en el caso de pFTX5).

Las mutaciones introducidas fueron comprobadas mediante secuenciación del DNA.

10.5. Purificación de DNA plasmídico

10.5.1. Purificación a pequeña escala de DNA plasmídico (Miniprep)

Para la preparación del plásmido a partir del cultivo bacteriano de *E. coli*, se ha utilizado el kit "GEN ELUTE™ PLASMID MINIPREP KIT" de Sigma. A partir de 5 ml de cultivo se obtiene un rendimiento de 15- 20 µg de DNA puro, para utilizar directamente en reacciones de secuenciación y digestiones enzimáticas. Los pasos principales de este kit se resumen a continuación:

- Recogida y resuspensión de células bacterianas.
- Lisis alcalina
- Neutralización y precipitación proteica y del DNA genómico
- Unión del DNA plasmídico a la resina de la columna
- Lavados de la columna por centrifugación
- Elución

10.5.2. Purificación a media escala de DNA plasmídico (Midiprep)

En las ocasiones en donde se ha requerido grandes cantidades de DNA plasmídico, se ha utilizado el kit "HIGH DANAPLASMID MIDI KIT" de Gene Dan, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

10.5.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA resueltos electroforéticamente en un gel de agarosa (ver apartado 10.6.2) se pueden recortar con una hoja de bisturí estéril y purificar a partir del gel mediante el kit "QIAquick Gel Extraction Kit" de QIAGEN, o con el kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" de GE Healthcare, siguiendo el protocolo del fabricante, para utilizarlos en aplicaciones posteriores.

10.5.4. Purificación de los productos de PCR o RT-PCR

Los productos de amplificación por PCR o RT-PCR se han purificado utilizando el kit "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare), siguiendo el

protocolo indicado por el fabricante. Este paso permite eliminar los primers, enzimas y sales utilizadas en la reacción, para obtener un DNA suficientemente limpio que puede ser utilizado en reacciones posteriores.

10.6. Electroforesis en geles de agarosa

10.6.1. Electroforesis analítica

Para ver el resultado de las digestiones de DNA y de la amplificación de ácidos nucleicos por PCR, se realizó una electroforesis de las muestras de DNA en geles de agarosa (Sigma) al 1% preparados en el tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8). Para visualizar el DNA mediante transiluminador, se añadió al gel "SYBR Safe DNA gel stain" (Invitrogen) a una dilución 1:10.000. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min.

10.6.2. Electroforesis preparativa

En las electroforesis en donde se ha requerido purificar el DNA de interés a partir de un gel de agarosa para una aplicación posterior, se utilizó agarosa de máxima pureza (Agarose Low electroendosmosis de Roche Ref. 11685660001). En estos casos se cargaron volúmenes grandes de muestra (50 - 100 µl por pocillo).

En ambas electroforesis, las muestras a cargar se diluyeron 1/6 en tampón de carga 6x (60 % glicerol, 12 % SDS, 0.6 % azul de bromofenol, 600 mM DTT, 300 mM Tris-Hcl pH 6.8).

10.6.3. Electroforesis de RNA en gel desnaturizante de formaldehído

El RNA (3 µl) obtenido de la transcripción in vitro (ver el apartado 10.7) o el RNA total extraído de los oocitos (ver apartado 10.1) se desnaturizó en 17 µl de RNA sample buffer que contenía 4 µl de formaldehído, 10 µl de formamida, 2 µl de tampón de electroforesis 10x MOPS (0.2 M MOPS pH 7, 20 mM acetato sódico, 10 mM EDTA pH 8) y 1 µl de bromuro de etidio (200 µg/µl) incubando la muestra durante 10 min a 85 °C y finalmente a 4 °C durante 10 min. Posteriormente se añadió 2 µl de tampón de carga 10x (50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8, Orange G). Se preparó un gel de agarosa al 1% en MOPS 1X que

contenía 2.2 M de formaldehído (se disolvió 1g de agarosa en 72 ml de H₂O y se calentó en el microondas, luego se dejó enfriar hasta 55 °C antes de añadir 18 ml de formaldehído y 10 ml de tampón de electroforesis 10x MOPS). Las muestras desnaturalizadas se resolvieron en este gel mediante electroforesis en MOPS 1X durante 15 min a 100 V. Transcurrida la electroforesis, se visualizó el gel en un transiluminador, y se cuantificó la concentración de RNA comparándola con muestras estándar y con la cuantificación obtenida por absorbancia.

10.7. Transcripción in Vitro de mRNA

El DNA plásmidico molde fue linealizado con el enzima de restricción apropiado y se purificó mediante una extracción fenol /cloroformo, se precipitó y posteriormente se resuspendió en 10 µl de H₂O ultra pura. A continuación se cuantificó 1 µl del DNA linealizado en un gel de agarosa al 1% (ver el apartado 10.6.1). La transcripción in vitro de mRNA a partir del DNA linealizado se realizó utilizando el kit ‘‘T7 mMESSAGE mMACHINE[®] High Yield Capped RNA Transcription Kit’’ (Ambion[®]) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Se comprobó la pureza del RNA obtenido y se cuantificó en un gel de agarosa con formaldehído (ver el apartado 10.6.3).

11. Análisis Estadístico

Los datos se expresan como media \pm SEM de un mínimo de tres experimentos. Se utilizó el Test-t de Student (muestras apareadas) para comparar la actividad caspasa-3 en oocitos tratados con o sin inhibidores. Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett en los experimentos de microinyección con distintos mRNAs comparandolos con los oocitos inyectados con agua. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

VI) RESULTADOS

1. Propiedades básicas de la vía de señalización de p38 en respuesta al shock hiperosmótico con sorbitol

Resultados previos de nuestro grupo han mostrado que el estrés hiperosmótico induce la apoptosis y la activación de las proteínas quinasas de estrés AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y JNK en los oocitos de *Xenopus laevis* (Martiañez *et al.*, 2009). Mediante el uso de este modelo celular, se describieran algunas propiedades básicas de las proteínas quinasas que son importantes para el control de los procesos irreversibles. Entre estas propiedades se incluyen: ultrasensibilidad (producir una gran respuesta a un pequeño incremento en el estímulo cuando se ha superado un nivel umbral), histéresis (activación sostenida cuando el estímulo ha desaparecido, es por tanto una forma de “memoria bioquímica”), y respuesta digital (activación de “todo-o-nada” a nivel de célula individual). Se comprobó que JNK presenta ultrasensibilidad, histéresis y una respuesta digital ante el shock hiperosmótico, mientras que la AMPK presenta ultrasensibilidad y respuesta digital, pero no histéresis (Martiañez *et al.*, 2009). También se propuso un modelo en que la integración de respuestas digitales en sensores de estrés (proteínas quinasas) determinaría el inicio del programa de muerte celular (López, 2010; Martiañez *et al.*, 2009).

Puesto que p38 MAPK es un sensor de la osmolaridad y está implicado en el control de la supervivencia celular, hemos considerado esta vía de señalización en nuestro modelo celular de apoptosis.

1.1. El shock hiperosmótico activa la vía de señalización de p38

Se ha descrito que el estrés hiperosmótico activa la vía de señalización de p38 en varios sistemas celulares, incluyendo levaduras y células de mamíferos (Brewster *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1994). Como se muestra en la figura 14, el shock hiperosmótico con sorbitol (400 mM) induce una fosforilación rápida de p38 (en Thr181 y Tyr183) en los oocitos de *Xenopus*, detectada con un anticuerpo específico para estos residuos. La actividad global de p38 se correlaciona bien con la fosforilación dual en estos residuos (Perez and Nolan, 2002). Por lo tanto, hemos cuantificado por Western blot la relación pp38/p38 y considerado este valor como actividad p38. El experimento de “time course” muestra que el shock hiperosmótico con sorbitol aumenta la actividad de p38 de forma progresiva durante 1 h y que permanece alta durante al menos 6 h (Fig. 14).

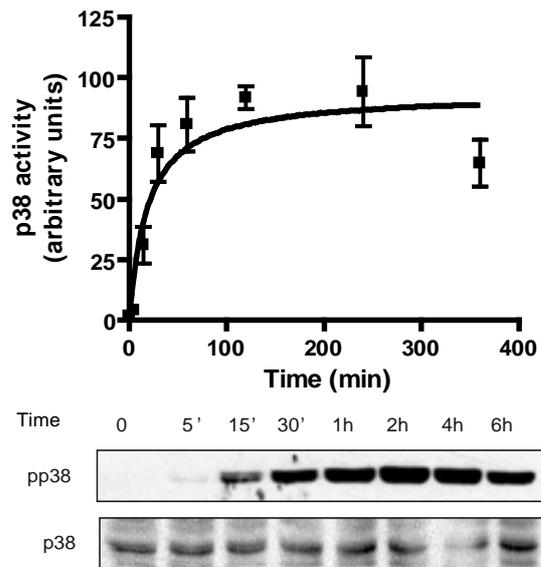


Figura 14. p38 se activa por shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus*. Activación de p38 en respuesta al tratamiento con sorbitol (400 mM). Los oocitos (estadio VI) se trataron con sorbitol (400 mM) y “pools” de 20 oocitos se lisaron a diferentes tiempos para analizar la actividad de p38 mediante Western blot. Los resultados se representan como relación pp38/p38, dando el valor del 100% al de mayor actividad, y son la media \pm SEM de 4 experimentos independientes. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

1.2. La respuesta de p38 al shock hiperosmótico es ultrasensible y monoestable

A continuación, se realizó un experimento de dosis-respuesta a las 4 h, un tiempo de respuesta que está claramente en estado estacionario (steady-state) (Fig. 14). La respuesta de p38 muestra una ultrasensibilidad muy alta a concentraciones crecientes de sorbitol (100-350 mM), con un coeficiente de Hill aparente de 14,4 (Fig. 15). Como he comentado anteriormente, los sistemas de señalización de AMPK y JNK también son ultrasensibles para el shock hiperosmótico con sorbitol, con coeficientes de Hill de 8,84 y 5,26, respectivamente (Martiañez et al., 2009).

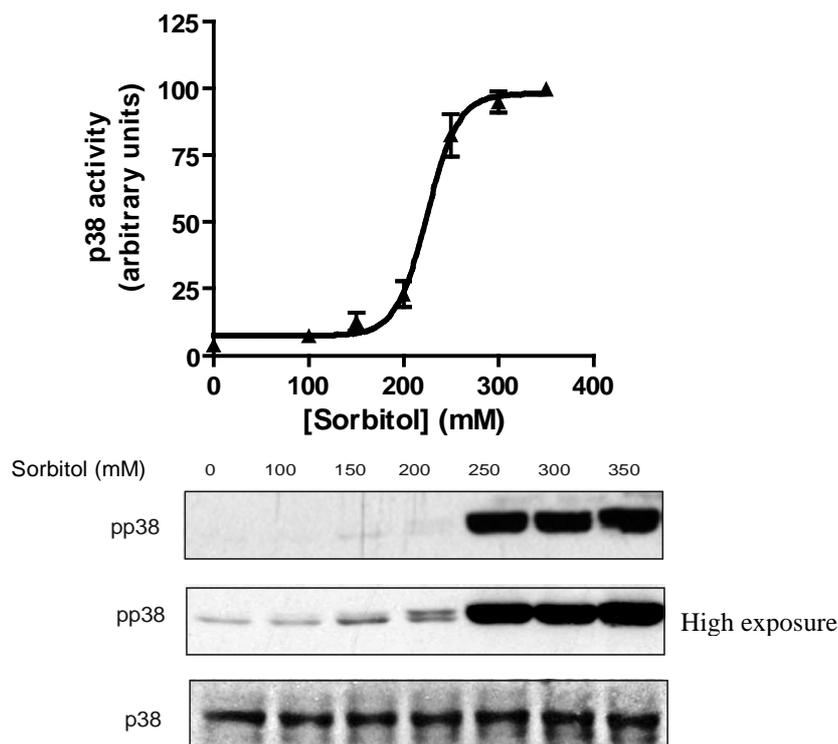


Figura 15. p38 es ultrasensible en respuesta al shock hiperosmótico. Los oocitos se trataron durante 4 h con concentraciones crecientes de sorbitol y "pools" de 20 oocitos se recogieron y lisaron para analizar la actividad de p38 mediante Western blot. Los resultados se representan como relación pp38/p38, dando el valor del 100% al de mayor actividad, y son la media \pm SE de 4 experimentos independientes. El coeficiente de Hill (nH) se calculó con el programa informático SAS 9.1 y se representó con el programa GraphPad Prism 4. El Western blot mostrado es de un experimento representativo. El panel central de pp38 presenta una mayor exposición que el superior para mostrar la fosforilación de p38 a 150 y 200 mM de sorbitol.

Para analizar la reversibilidad de la respuesta de p38 se incubaron los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 4 h, se lavaron varias veces con el medio MBS normal y a continuación se mantuvieron en MBS sin sorbitol. Se encontró que la actividad de p38 disminuyó notablemente después del lavado, aunque no retornó completamente a los niveles basales (Fig. 16). Podemos concluir que la respuesta de p38 al estrés hiperosmótico es ultrasensible y monoestable, muy similar a la AMPK y en contraste con la respuesta biestable de JNK descrita anteriormente (Bagowski *et al.*, 2001; Martiáñez *et al.*, 2009).

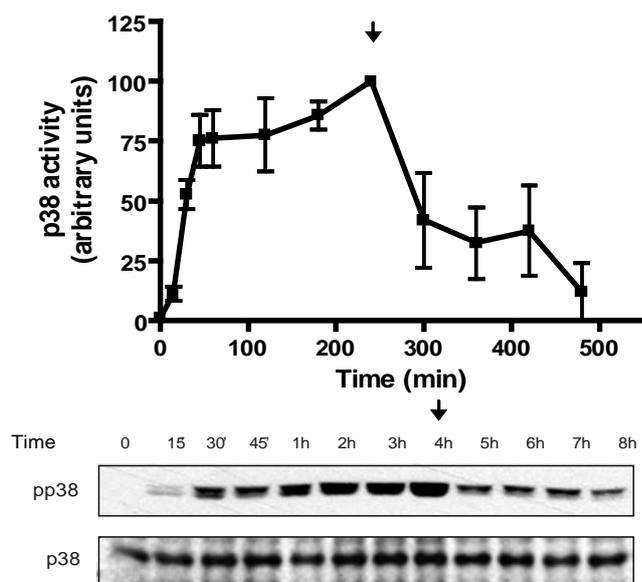


Figura 16. Monoestabilidad en el sistema de señalización de p38. “Time course” de la actividad p38 en “pools” de oocitos tratados con sorbitol (300 mM). A partir de las 4 h (véase flecha superior), los oocitos se lavaron varias veces en medio MBS y se mantuvieron sin sorbitol. Se recogieron “pools” de 20 oocitos a distintos tiempos y se determinó pp38 por Western blot. Los resultados se representan como relación pp38/p38, dando el valor del 100% al de mayor actividad, y son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

1.3. Respuesta bimodal de p38 ante el shock hiperosmótico en oocitos individuales

Como se ha descrito anteriormente para la AMPK y JNK (Bagowski *et al.*, 2001; Martiáñez *et al.*, 2009), la respuesta ultrasensible observada a nivel de una población de oocitos puede ser debida a los oocitos individuales que exhiben respuesta gradual (analogica) o bien respuesta de todo-o-nada (digital). Por otra parte, hemos descrito que la respuesta digital de AMPK y JNK al shock hiperosmótico es dependiente del tiempo (gradual a 2 h, pero digital a 4 h) (Martiáñez *et al.*, 2009). Por lo tanto, hemos examinado la respuesta de p38 ante el shock osmótico con sorbitol a diferentes tiempos en las células individuales. Como se muestra en la Figura 4A, la incubación con una concentración intermedia de sorbitol (200 mM) durante 2 h induce una respuesta homogénea de p38 en los oocitos individuales con un pico máximo de distribución alrededor del 20% de actividad, y una cola extendida hacia la derecha, considerando 100% de actividad los oocitos individuales tratados con sorbitol (400 mM) durante 4 h. Sin embargo, la incubación de los oocitos con una concentración intermedia de sorbitol (200 mM) durante 4 h produce una distribución bimodal de la actividad p38, con dos picos distribuidos en el 15% y el 50% (Fig. 17B). Se observó cierta variabilidad en los Western blots cuando se

midió la p38 total, pero esto podría ser debido al “stripping” de las membranas, que es siempre necesario en el análisis de los oocitos individuales. Mediante los análisis de Western blot se observó una buena correlación entre la activación de p38 y la liberación de citocromo c a las 4 h en los oocitos individuales (Fig. 17B). Sin embargo, esta correlación no fue tan clara en los oocitos incubados durante 2 h (véase la flecha en la Fig. 17A).

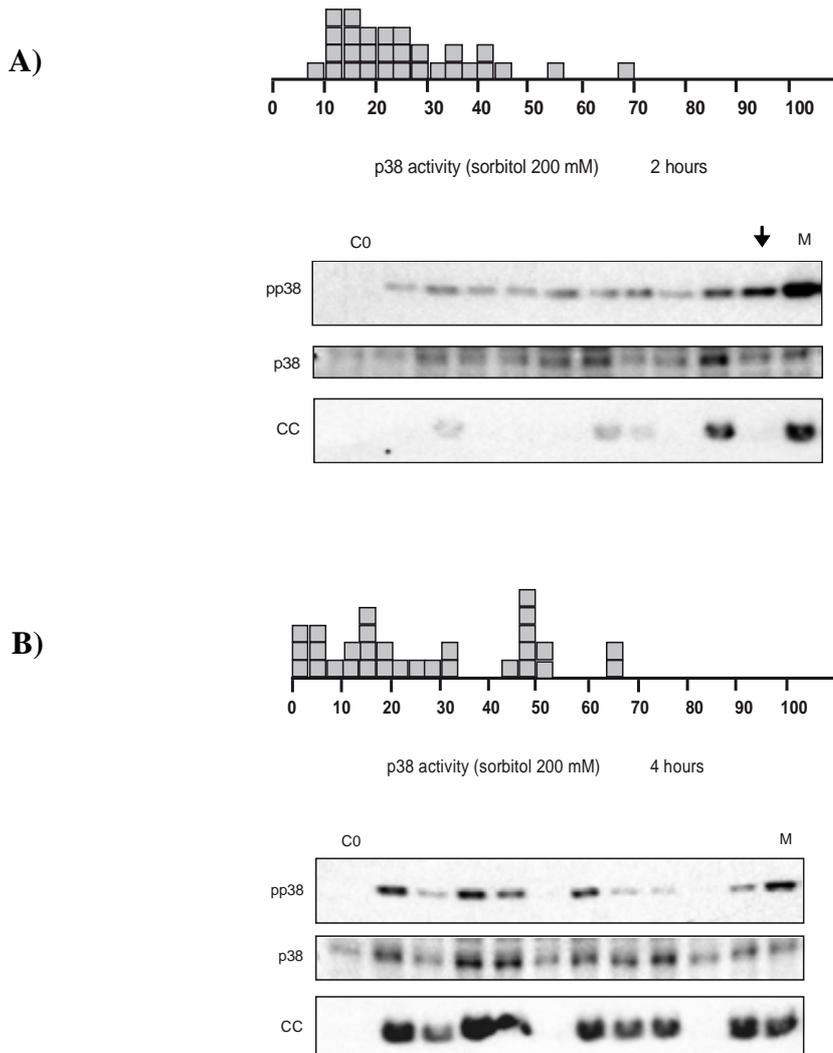


Figura 17. Respuesta bimodal y dependiente de tiempo de p38 ante el shock hiperosmótico y correlación con la salida de citocromo c en células individuales. (A) Se trataron los oocitos con sorbitol (200 mM) durante 2 h y se cuantificó por Western blot la actividad de p38. Los resultados se representan como relación pp38/p38, dando la actividad máxima (valor 100%) a los oocitos tratados con sorbitol 400 mM (M), y como control de actividad mínima se utilizan oocitos sin tratar (CO). La flecha indica la falta de correlación entre actividad p38 y salida de citocromo c. Cada cuadro representa un oocito individual. Los resultados agrupan 3 experimentos independientes. (B) Actividad de p38 en oocitos individuales tratados durante 4 h con sorbitol 200 mM. La actividad se cuantificó por Western blot tal como se describe anteriormente. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

1.4. La activación de caspasa-3 induce la fosforilación de p38

La inyección de citocromo c en los oocitos de *Xenopus* induce rápidamente la activación de caspasa-3 (30 min) (Fig. 18A) y después la fosforilación de p38 (1 h) (Fig. 18B). Este efecto es inhibido por el inhibidor general de caspasas Z-VAD.fmk y por el inhibidor específico de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO (Fig. 18C), demostrando que la fosforilación de p38 inducida por el citocromo c es dependiente de la actividad caspasa-3. Estos resultados sugieren una activación rápida de la vía de señalización de p38 como respuesta al shock hiperosmótico (Fig. 14) y una activación lenta inducida por la salida de citocromo c y la activación de la caspasa-3 (Fig. 18), lo que explicaría la buena correlación obtenida entre la salida de citocromo c y la activación de p38 a las 4 h después del tratamiento (Fig. 17B).

Como se ha indicado anteriormente, en algunos oocitos individuales no se observó una buena correlación entre la actividad p38 y la liberación de citocromo c (Fig. 17A). Estos resultados sugieren que además de la activación de p38, hay otros factores que podrían regular la salida temprana del citocromo c inducida en respuesta al shock hiperosmótico.

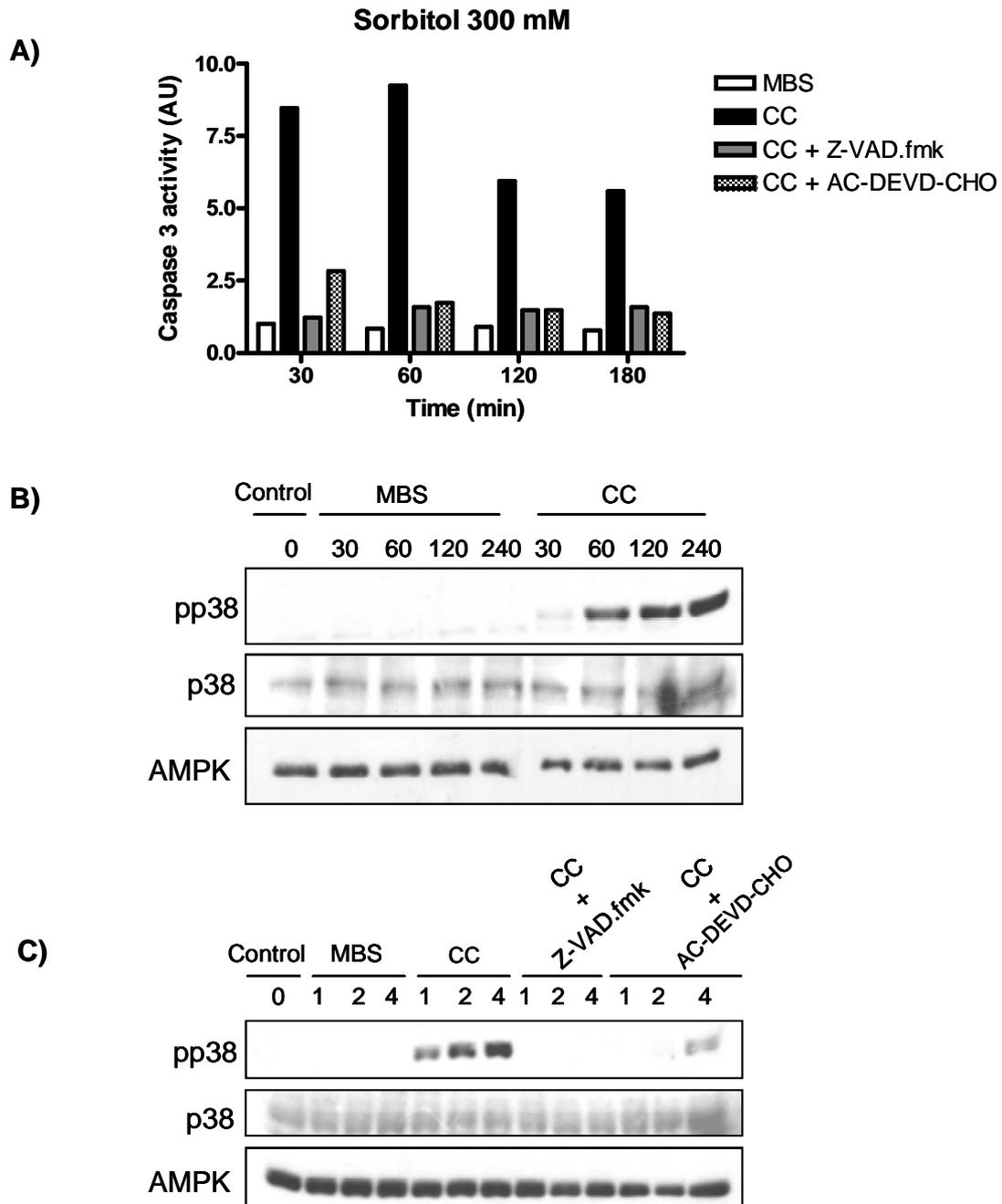


Figura 18. La inyección de citocromo c induce la activación de caspasa-3 y la fosforilación de p38. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl de citocromo c (CC) disuelto en MBS 1X obteniendo una concentración final en el oocito de 0,5 μ M, en ausencia o presencia del inhibidor Z-VAD.fmk (concentración final en el oocito 5 μ M), o del inhibidor Ac-DEVD-CHO (concentración final en el oocito 100 nM). Como control de inyección, se inyectaron los oocitos con 50 nl de MBS 1X. Se obtuvieron extractos citosólicos a distintos tiempos después de la inyección y se determinó la actividad caspasa-3 como la concentración del compuesto AMC fluorescente formado a partir del sustrato Z-DEVD-AMC y se representó los resultados como unidades arbitrarias de actividad caspasa-3 dando el valor 1 a los oocitos inyectados con MBS. (B) Western blot para determinar los niveles de pp38, p38 y AMPK (control de carga) en oocitos control, inyectados con MBS o con CC. (C) Western blot para cuantificar los niveles de pp38, p38 y AMPK en oocitos inyectados con CC en presencia de los inhibidores Z-VAD.fmk y AC-DEVD-CHO. El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos independientes.

2. La inhibición de las vías de señalización de p38 y JNK por compuestos químicos reduce la apoptosis inducida por estrés osmótico

Como se comentó anteriormente, el shock hiperosmótico induce la liberación del citocromo c y la activación de caspasa-3 entre 2 y 4 h después del tratamiento con sorbitol (Martiañez et al., 2009). Puesto que p38 y JNK se han involucrado en la regulación de la muerte celular en varios tipos celulares, se abordó el papel de estas proteínas quinasas en la regulación de la apoptosis de los oocitos inducida por shock hiperosmótico. No se observó ninguna reducción significativa en la liberación de citocromo c (Fig. 19B) y la activación de caspasa-3 (Fig. 19A) inducida por estrés osmótico en oocitos incubados con los inhibidores de p38 SB203580 o BIRB796, que inhiben la p38 α/β o bien todas las isoformas de p38, respectivamente. Como se muestra en la figura 19B los compuestos SB203580 y BIRB796 reducen la fosforilación de p38 pero no inhiben la AMPK, mientras que BIRB796 inhibe parcialmente JNK, tal como se ha descrito previamente (Kuma *et al.*, 2005).

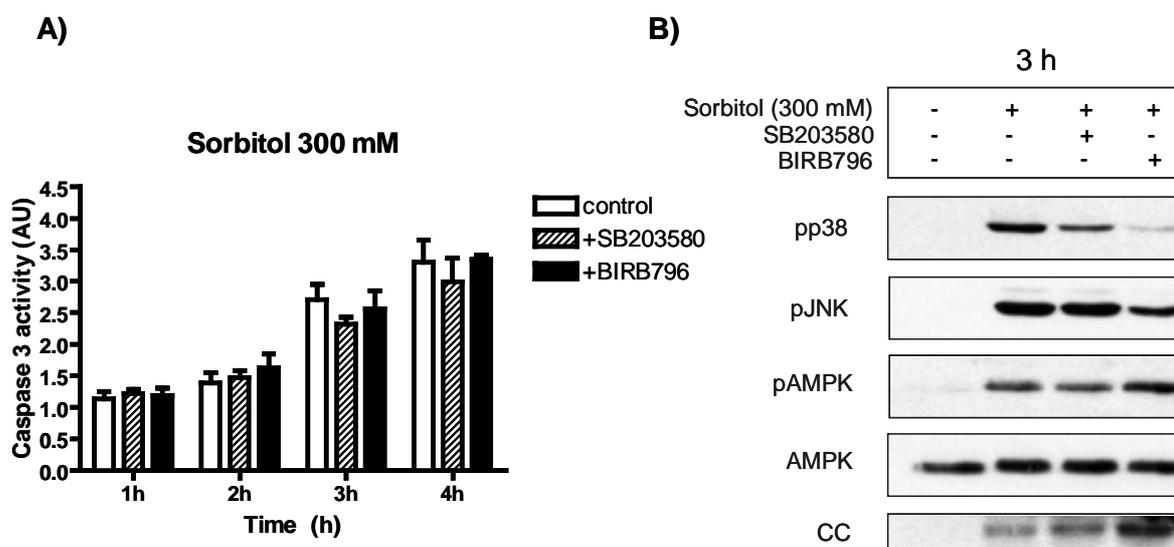


Figura 19. SB203580 o BIRB796 no inhiben la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock osmótico. (A) Se pre-incubaron los oocitos con SB203580 (100 μ M) o con BIRB796 (100 μ M) disueltos en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores durante 4 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3 como la concentración del compuesto AMC fluorescente formado a partir del sustrato Z-DEVD-AMC y se representaron los resultados como unidades arbitrarias de actividad caspasa-3 dando el valor 1 a los oocitos no tratados. Los resultados son la media \pm SEM de 4 experimentos independientes que se analizaron con el Test-t de student (muestras apareadas) para comparar la actividad caspasa-3 en oocitos tratados con o sin inhibidores. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos. (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de pp38, pJNK, pAMPK, AMPK y citocromo c (CC) en oocitos tratados con sorbitol 300 mM durante 3 h en presencia y en ausencia de los inhibidores. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

Asimismo, el inhibidor específico de JNK SP600125 no disminuye significativamente la actividad caspasa-3 (Fig. 20A) y no inhibe la liberación de citocromo c inducida por el shock osmótico (Fig. 20B).

Curiosamente, se observó un pequeño aumento (estadísticamente significativo) de la actividad caspasa-3 1 h después del shock osmótico en presencia del inhibidor de JNK, indicando que JNK podría tener un papel anti-apoptótico a tiempos cortos de activación (Fig. 20A).

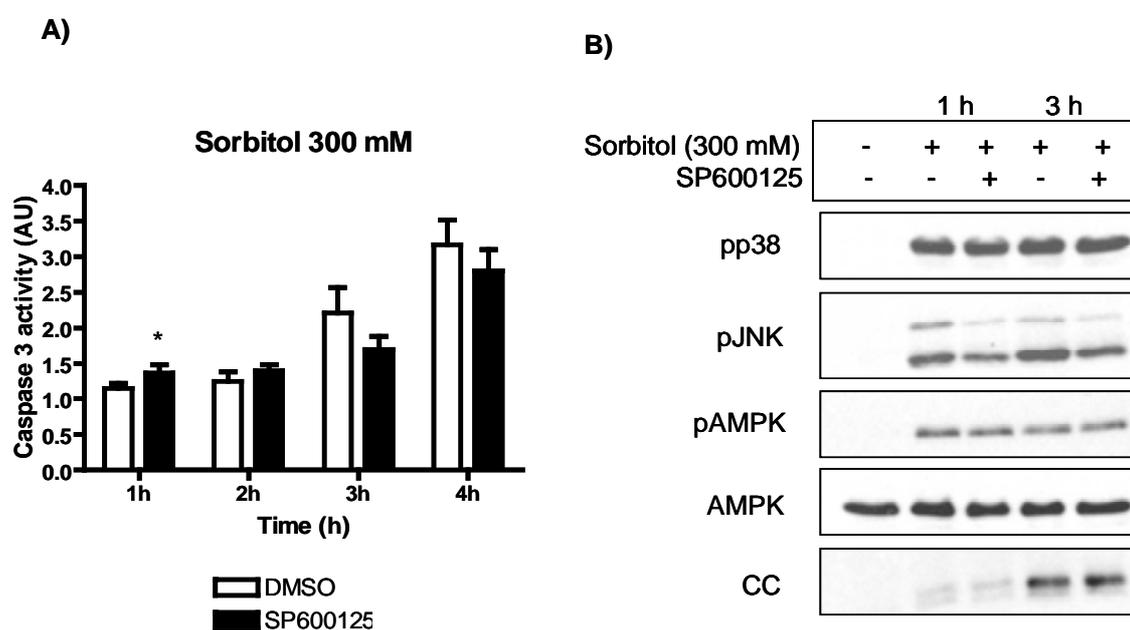


Figura 20. El inhibidor de JNK (SP600125) no inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock hiperosmótico. (A) Se pre-incubaron los oocitos con SP600125 (100 μ M) disuelto en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia del inhibidor durante 4 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3 como se ha descrito anteriormente. Los resultados son la media \pm SEM de 6 experimentos independientes que se analizaron con el Test-t de student (muestras apareadas) para comparar la actividad caspasa-3 en oocitos tratados con o sin inhibidores. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de pJNK, pp38 pAMPK, AMPK y citocromo c (CC) en oocitos tratados con sorbitol 300 mM durante 1 h y 3 h en presencia y en ausencia del inhibidor. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

Cuando se incubaron los oocitos con sorbitol 300 mM en presencia de ambos inhibidores (BIRB796 y SP600125) se observó una reducción significativa de la actividad enzimática de caspasa-3 a las 4 h (Fig. 21A), que fue acompañada por una reducción en la liberación del citocromo c y de la actividad caspasa-3 medida como proteólisis de caspasa-3 por Western blot (Fig. 21B). Sin embargo, una hora después (a las 5 h de tratamiento) la actividad caspasa-3 se incrementó tanto en presencia como en ausencia de los inhibidores. Las diferencias entre oocitos control e incubados con inhibidores todavía fueron significativas, aunque por poco ($p=0.0418$). Los resultados anteriores sugieren que la inhibición de la vía de p38 y JNK reduce la liberación del citocromo c y la activación de caspasa-3, pero no bloquea completamente la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.

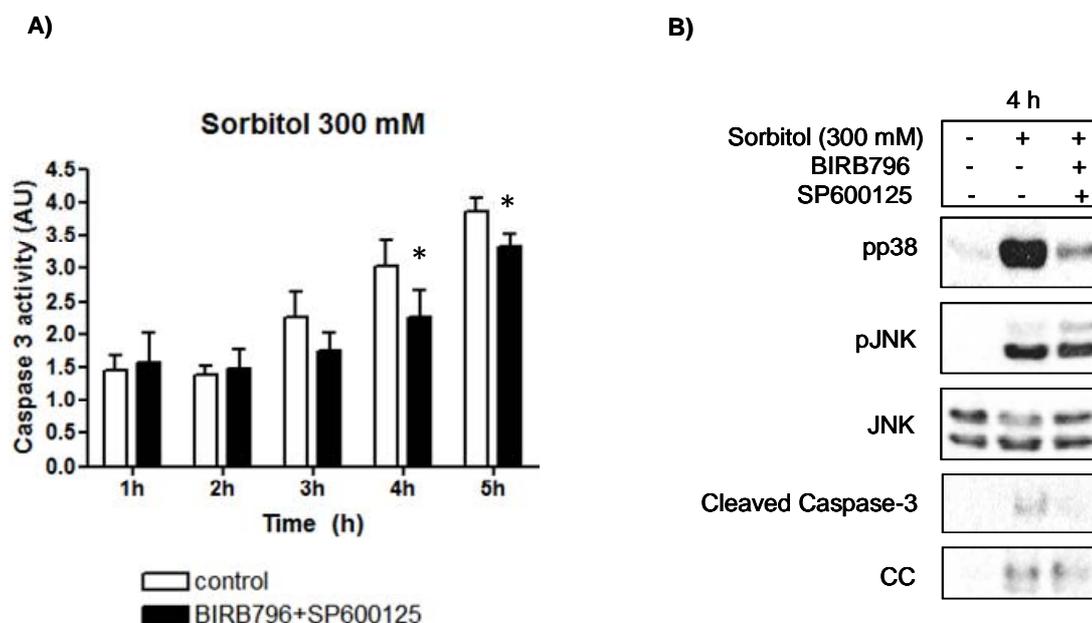


Figura 21. La combinación SP600125 + BIRB796 inhibe parcialmente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock hiperosmótico. (A) Se pre-incubaron los oocitos con una combinación de SP600125 (100 μ M) y BIRB796 (100 μ M) disueltos en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores durante 4 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3 como se describe anteriormente. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con el Test-t de student (muestras apareadas) para comparar la actividad caspasa-3 en oocitos tratados con o sin inhibidores. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de pJNK, JNK, pp38, caspasa-3 proteólizada y citocromo c (CC) en oocitos tratados con sorbitol 300 mM durante 4 h en presencia y ausencia de los inhibidores. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

3. Papel de la vía de señalización de p38 en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

3.1. La expresión del constitutivo activo de MKK6 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

Para obtener más información sobre la función específica de p38 durante la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, expresamos un mutante de MKK6 (MKK6-DD), que tiene substituidos los aminoácidos Ser-207 y Thr-211 por Glu y que corresponden a los dos sitios de fosforilación en el bucle de activación, y que se ha descrito actúa como constitutivo activo en oocitos de *Xenopus* (Alonso *et al.*, 2000; Perdiguero *et al.*, 2003). Como puede observarse en la figura 22 la expresión de MKK6-DD activa la vía de señalización de p38 pero no la de JNK, mientras que la expresión de un mutante de MKK6 sin actividad quinasa (MKK6-DA), que tiene mutado el aminoácido Glu-197 por Ala y que se ha descrito puede actuar como dominante negativo en *Xenopus* (Alonso *et al.*, 2000), no tiene ningún efecto en ambas vías de señalización, como era de esperar. (Fig. 22).

Los resultados obtenidos con MKK6-DD y MKK6-DA en los oocitos de *Xenopus* están de acuerdo con los datos publicados anteriormente (Alonso *et al.*, 2000; Perdiguero *et al.*, 2003). El shock osmótico con sorbitol en los oocitos que expresan MKK6 induce la activación de las vías de señalización de p38 y JNK, como se esperaba (Fig. 22).

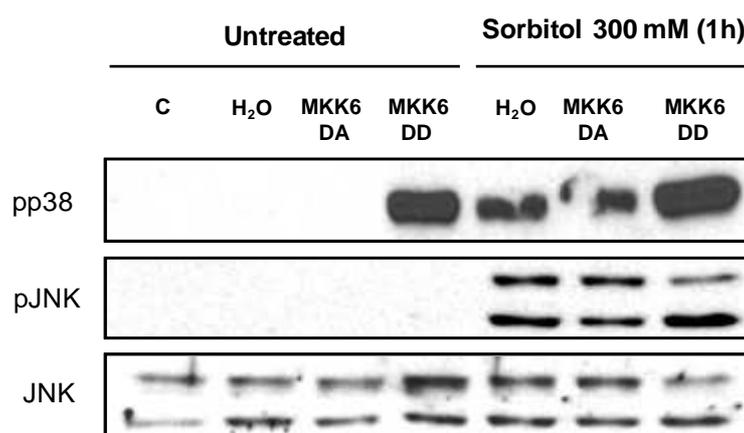


Figura 22. Activación de la vía de p38 por la expresión del constitutivo activo de MKK6 (MKK6-DD) en oocitos de *Xenopus*. Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MKK6-DD o MKK6-DA y 18 h después se obtuvieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 1 h para analizarlos por Western blot y determinar los niveles de pp38, pJNK y JNK. Como controles, algunos oocitos no se inyectaron (C) o bien se inyectaron con 50 nl de H₂O.

A continuación, se analizó la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 en los oocitos que expresaban MKK6. Los oocitos no tratados e inyectados con los diferentes mRNAs durante 18 h (para permitir su expresión) no mostraron ningún cambio significativo en la activación de caspasa-3 (Fig. 23A) ni en la salida de citocromo c (Fig. 23B) respecto a los oocitos inyectados con agua. La fosforilación de p38 se encuentra aumentada en los oocitos que expresan MKK6-DD, mientras que esto no ocurre con MKK6-DA (Fig. 23B). Estos resultados indican que la activación de la vía de señalización de p38 no es suficiente para inducir la apoptosis en los oocitos de *Xenopus*. El tratamiento de los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 1 h induce un aumento de la actividad caspasa-3 en los oocitos inyectados con el constitutivo activo MKK6-DD, que es estadísticamente significativo (Fig. 23A) y se correlaciona con una salida temprana de citocromo c (Fig. 23B). Cuando analizamos la apoptosis después de 3 h de tratamiento con sorbitol, no se encontró ningún cambio significativo entre las distintas condiciones, presentando una elevada actividad caspasa-3 y salida de citocromo c (Fig. 23A y B). Como era de esperar, el shock osmótico activa p38 en todas las condiciones (Fig. 23B).

La aceleración de la apoptosis inducida por el constitutivo activo MKK6-DD es bloqueada con los inhibidores de p38 SB203580 o BIRB796, que inhiben las isoformas p38 α/β o bien todas las isoformas de p38, respectivamente (Fig. 24), indicando que la activación sostenida de p38 α/β favorece la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3.

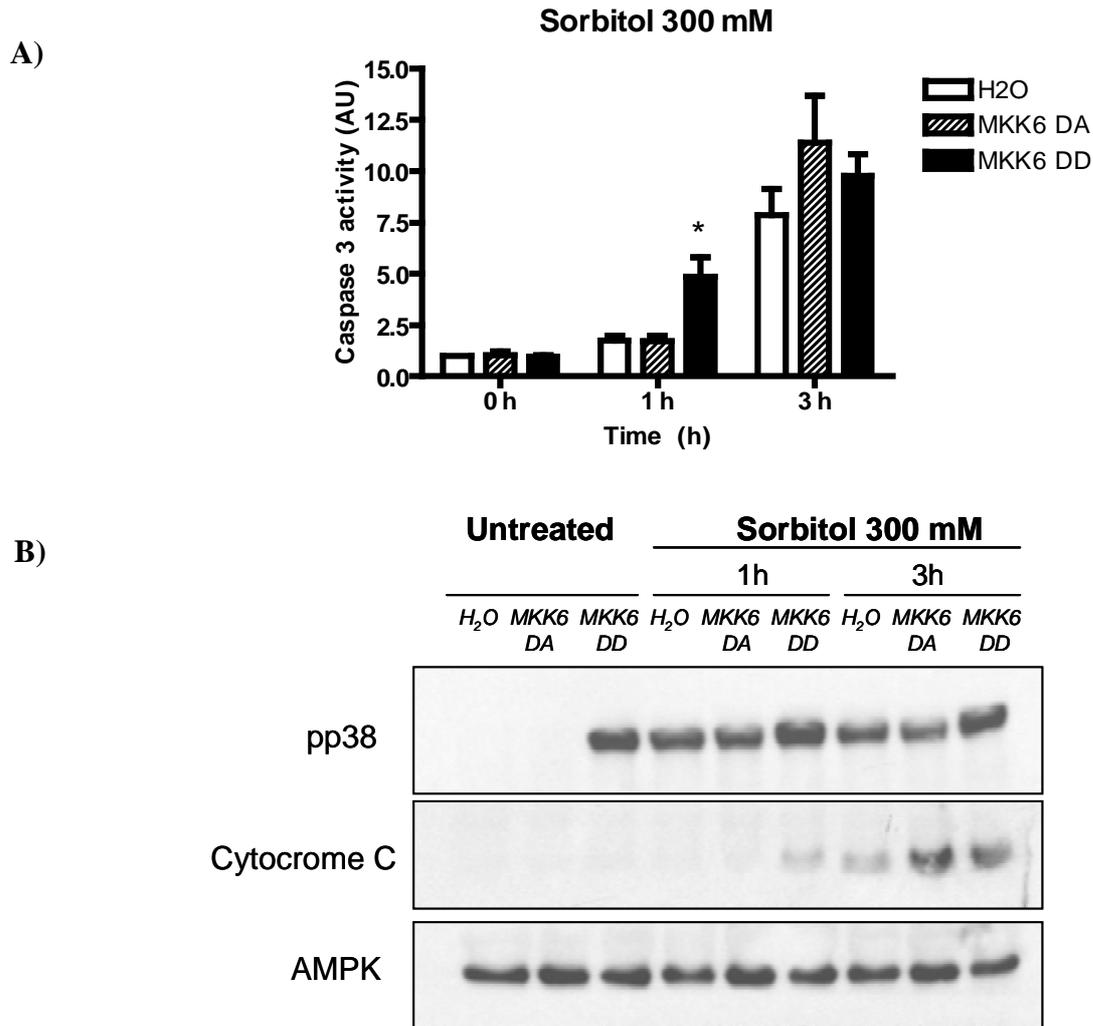


Figura 23. La expresión del constitutivo activo de MKK6 (MKK6-DD) acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MKK6-DD o MKK6-DA y 18 h después se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 y 3 h. Se obtuvieron extractos citosólicos y se determinó la actividad caspasa-3 como se ha descrito anteriormente. Algunos oocitos se inyectaron con 50 nl de H₂O como control. Los resultados son la media ± SEM de 4 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con mRNAs con los inyectados con agua. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de pp38, citocromo c y AMPK (control de carga). El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

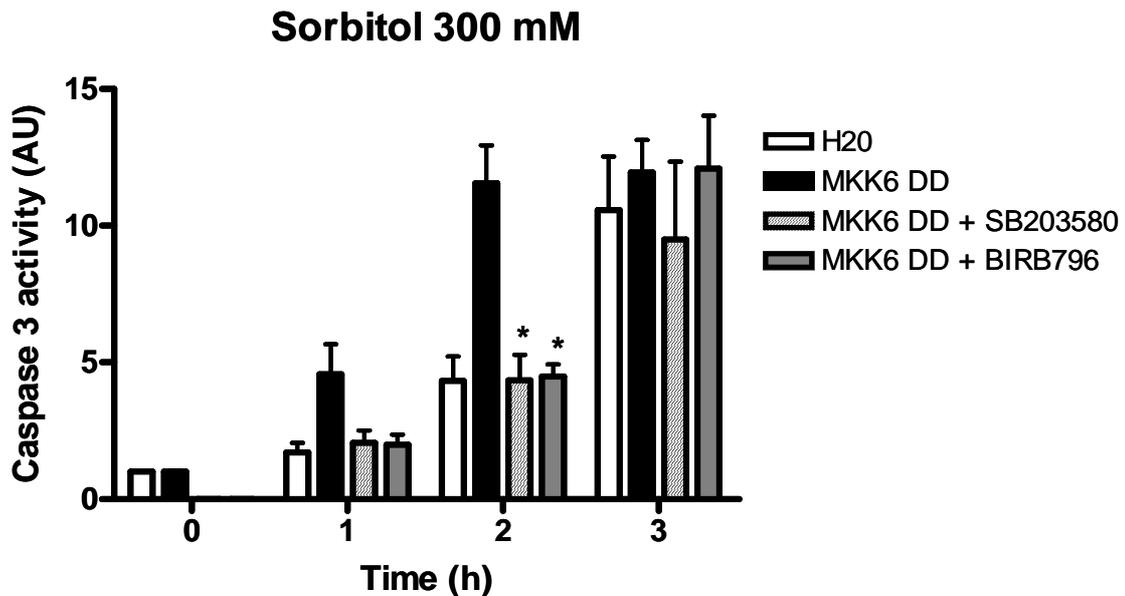


Figura 24. La aceleración de la apoptosis inducida por el constitutivo activo de MKK6 es debida a la activación de p38 α/β . Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) del mRNA para MKK6-DD y se incubaron con SB203580 (100 μ M) y con BIRB796 (100 μ M) disueltos en MBS 1X durante 18 h. A continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores, se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. Como control, se inyectaron oocitos con 50 nl de H₂O y se incubaron con sorbitol a distintos tiempos. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el Test de Dunnett comparando la actividad caspasa-3 de los oocitos inyectados con MKK6-DD más inhibidores respecto a los oocitos inyectados con MKK6-DD. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*).

3.2. La expresión de las isoformas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ y sus mutantes inactivos no modifican la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

A continuación, se estudió el efecto de la expresión de las isoformas salvajes p38 α , p38 β , p38 γ (de *Xenopus laevis*), p38 δ (de *Xenopus tropicalis*) y sus mutantes catalíticamente inactivos mediante experimentos de microinyección. Tanto las isoformas de p38 como los mutantes (p38 α -AF, p38 α -KR, p38 β -AF, p38 β -KR, p38 δ -AF, p38 δ -KR, y p38 γ -DA) tienen un epítipo myc en el extremo amino-terminal, y se expresan de forma eficiente en los oocitos microinyectados con sus respectivos mRNAs (Fig. 25B y 26B). Se ha descrito que los mutantes p38 α -AF (que tiene substituidos los aminoácidos Thr181 y Tyr183 por Ala y Phe, respectivamente) y p38 α -KR (que tiene substituido el aminoácido Lys-54 por Arg) actúan como dominantes negativos en diferentes estudios (Lee *et al.*, 2005; Raingeaud *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998b). p38 γ -DA (que tiene substituido el aminoácido Asp-171 por Ala) se ha descrito como un mutante catalíticamente inactivo que inhibe la maduración inducida por progesterona (Perdiguero *et al.*, 2003). Los oocitos no tratados e

inyectados con los diferentes mRNAs durante 18 h no mostraron ningún cambio significativo en la actividad caspasa-3 o en la salida de citocromo c respecto a los oocitos inyectados con agua (Fig. 25B y 26B). El tratamiento con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h de los oocitos que expresan p38 α o p38 γ induce la fosforilación de estas isoformas, aunque no muestra ningún cambio significativo en la activación de caspasa-3 y en la salida de citocromo c (Fig. 25C, D, E, F). Como era de esperar, el mutante p38 α -AF no se fosforila en los oocitos tratados con sorbitol (Fig. 25D y F).

Por otro lado, el tratamiento con sorbitol de los oocitos que expresan las isoformas p38 β o p38 δ induce la fosforilación de p38 β , pero no la de p38 δ que tiene un peso molecular más elevado que las otras isoformas (Fig. 26B, D, F). p38 β -AF (que tiene substituidos los aminoácidos Thr179 y Tyr181 por Ala y Phe, respectivamente), no se fosforila en los oocitos tratados con sorbitol, mientras que p38 β -KR (que tiene substituido el aminoácido Lys-52 por Arg) si que se fosforila (Fig. 26D). La expresión de las formas salvajes o mutantes (AF y KR) de p38 β y p38 δ no altera significativamente la actividad caspasa-3 inducida por estrés osmótico en comparación con los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 26A, C, E). Cabe resaltar, no obstante, un ligero aumento de la actividad caspasa-3 1 h y 3 h después del tratamiento en los oocitos que expresan p38 β y una disminución en los que expresan p38 β -AF con respecto a los oocitos inyectados con H₂O, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas (Fig. 26C y E). Por otro lado, los oocitos que expresan p38 β -AF, p38 β -KR o cualquiera de las versiones de p38 δ (salvaje o mutantes) presentan una disminución en la salida de citocromo c a las 3 h de tratamiento con sorbitol respecto a los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 26F).

En resumen, los resultados anteriores indican que el shock osmótico con sorbitol induce únicamente la activación de p38 α , p38 β y p38 γ en los oocitos de *Xenopus*, y que la expresión de estas isoformas o sus mutantes no alteran significativamente la apoptosis inducida por el shock osmótico. Los datos también sugieren que p38 β podría ser pro-apoptótico.

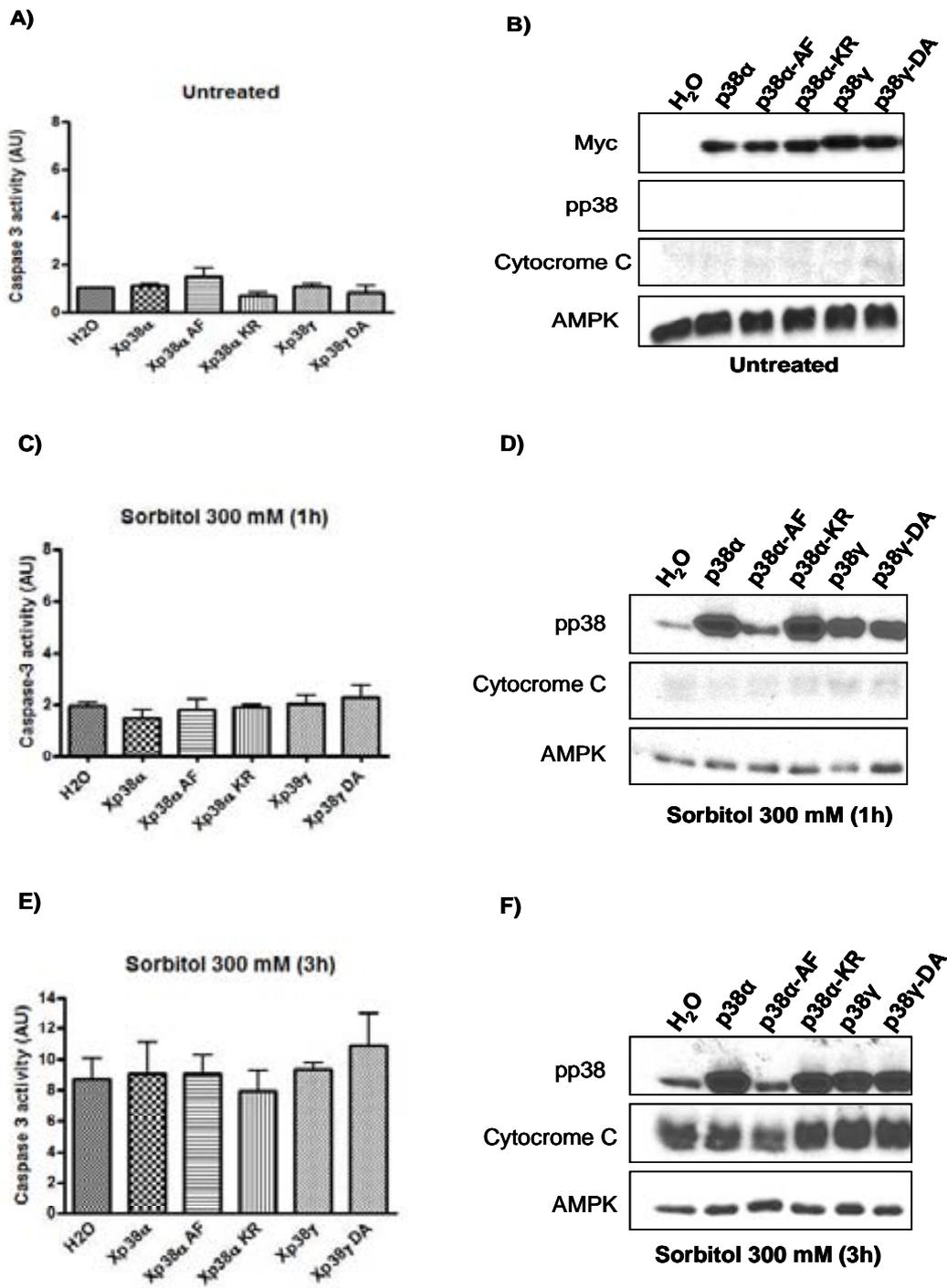


Figura 25. La expresión de p38α y p38γ salvaje o sus mutantes inactivos no modifica la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para p38α, p38α-AF, p38α-KR, p38γ, o p38γ-DA y 18 h después se determinó la actividad caspasa-3. Como control se inyectaron oocitos con H₂O. (B) La expresión de las proteínas a partir de los diferentes mRNAs inyectados se confirmó por Western blot con anticuerpos para myc. Se analizó también pp38 y la salida de citocromo c mediante Western blot y como control de carga la AMPK. (C, D, E, F) Los oocitos inyectados con los mRNAs e incubados durante 18 h se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h y se determinó la actividad caspasa-3, la fosforilación de p38 y la salida de citocromo c como se ha descrito previamente. Los resultados de la actividad caspasa-3 en los paneles A, C, E se representan como la media ± SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett. Los Western blot mostrados son de un experimento representativo.

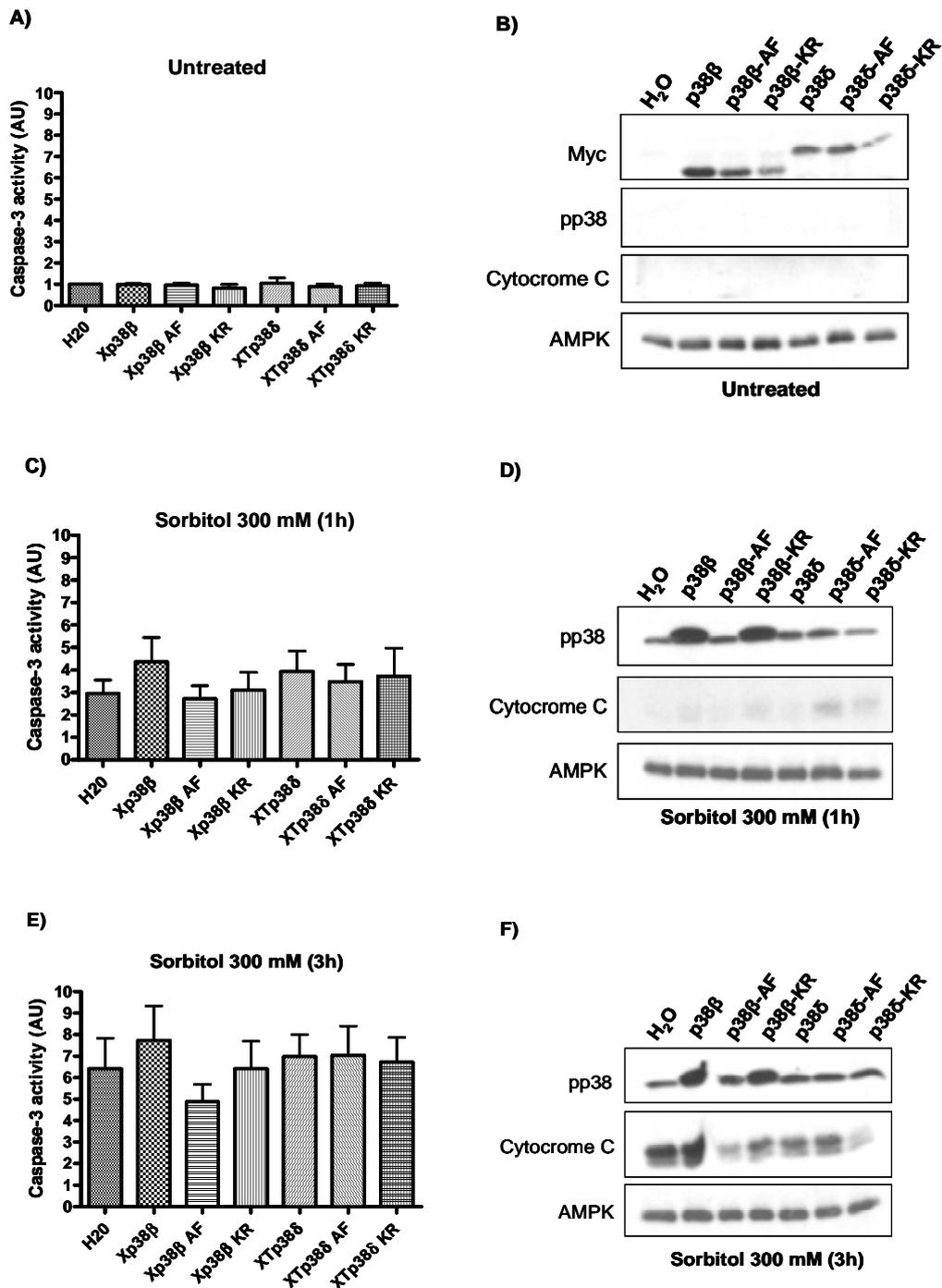


Figura 26. La expresión de p38β y p38δ salvage o sus mutantes inactivos no modifica la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para p38β, p38β-AF, p38β-KR, p38δ, p38δ-AF, y p38δ-KR y 18 h después se determinó la actividad caspasa-3. Como control se inyectaron oocitos con H₂O. (B) La expresión de las proteínas a partir de los diferentes mRNAs inyectados se confirmó por Western blot con anticuerpos para myc. Se analizó también pp38 y la salida de citocromo c mediante Western blot y como control de carga la AMPK. (C, D, E, F) Los oocitos inyectados con los mRNAs e incubados durante 18 h se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h y se determinó la actividad caspasa-3, la fosforilación de p38 y la salida de citocromo c como se ha descrito previamente. Los resultados de la actividad caspasa-3 en los paneles A, C, E se representan como la media ± SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett. Los Western blot mostrados son de un experimento representativo.

Puesto que no se observó fosforilación de p38 δ de *Xenopus* inducida por el shock hiperosmótico, y ya que podrían existir diferencias entre especies, se analizó la expresión de p38 δ humano en los oocitos de *Xenopus* tratados con sorbitol durante 1 h. Como puede verse en la figura 27, el shock hiperosmótico induce un aumento significativo de la fosforilación de p38 δ humano, aunque mucho menor que la fosforilación inducida en p38 β de *Xenopus* (Fig. 27D), pero no modifica la activación de caspasa-3 en oocitos inyectados con los mRNAs salvajes o mutantes (AF y KR) de p38 δ humano en comparación con los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 27A, B, C).

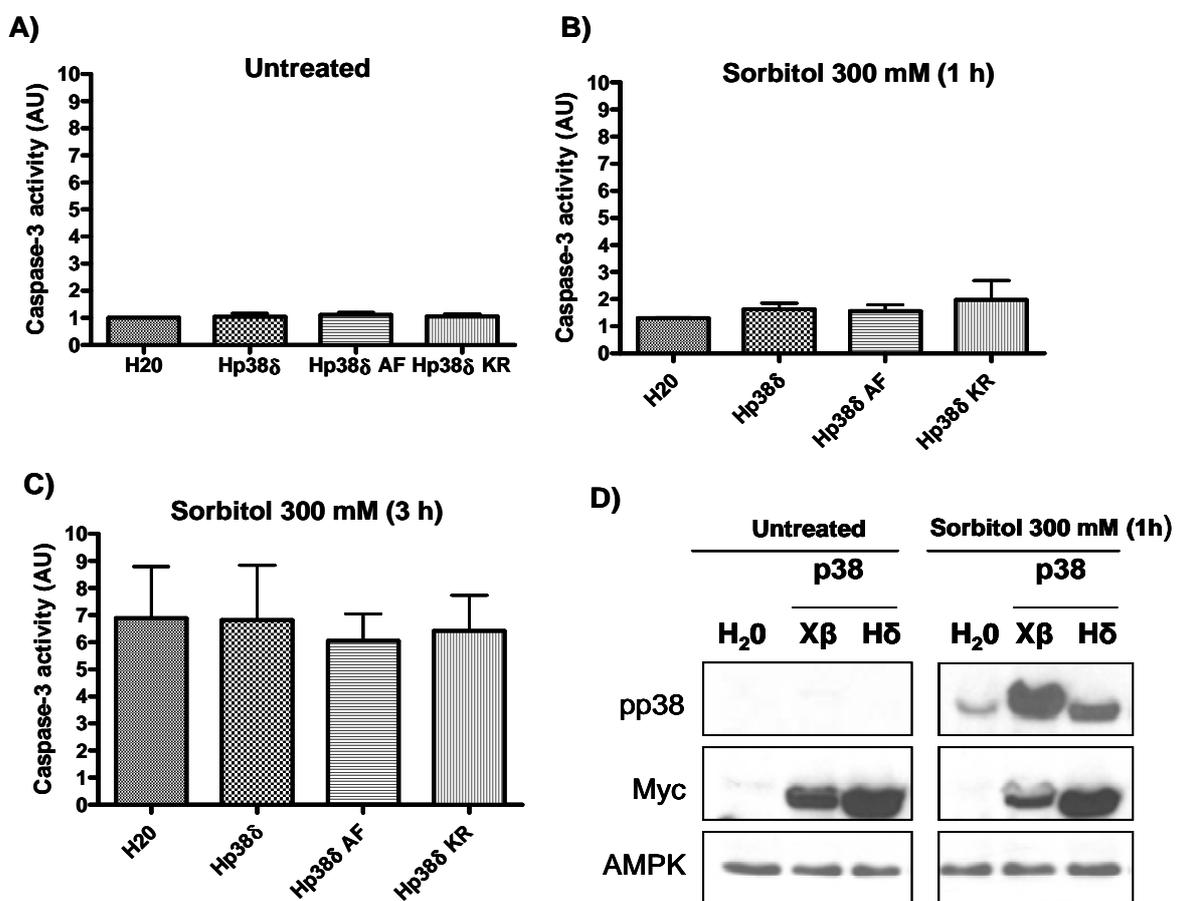


Figura 27. p38 δ humano salvaje o sus mutantes inactivos no modifican la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*, a pesar de que p38 δ humano salvaje se fosforila. (A, B, C) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para p38 δ , p38 δ -AF o p38 δ -KR humano y 18 h después se obtuvieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h y se determinó la actividad caspasa-3. Como control se inyectaron oocitos con H₂O y se trataron con sorbitol a distintos tiempos. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. (D) Se cuantificó por Western blot los niveles de pp38, myc (control de expresión) y AMPK (control de carga) en oocitos inyectados con H₂O, p38 β de *Xenopus*, y p38 δ humano. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

3.3. La expresión combinada de MKK6-DD y p38 β , p38 δ o p38 γ inhibe la aceleración de la apoptosis inducida por MKK6-DD

Como ya se comentó en el apartado 3.1, la expresión de un constitutivo activo de MKK6 (MKK6-DD) acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. A continuación, estudiamos si la expresión combinada de MKK6-DD y p38 α , p38 β , p38 γ o p38 δ puede inducir apoptosis, o bien afectar a la aceleración de la apoptosis inducida por MKK6-DD. Los oocitos no tratados e inyectados con los diferentes mRNAs no mostraron ningún cambio significativo en la actividad caspasa-3 y en la salida de citocromo c después de 18 h de la inyección (Fig. 28A, D, G). p38 presenta una fosforilación significativa en los oocitos que expresan MKK6-DD, y que es más elevada en los oocitos que expresan MKK6-DD junto con p38 α , p38 β , p38 δ , o p38 γ (Fig. 28G). Aunque la combinación MKK6-DD más p38 δ incrementó los niveles de p38 endógeno (Fig. 28G), no se observó fosforilación de p38 δ (tiene un peso molecular superior a las otras isoformas de p38) tal como se ha indicado anteriormente (Fig. 26B).

Hay que destacar que la expresión de MKK6-DD y p38 γ provocó la aparición de una mancha blanca (‘‘white spot’’) en el polo animal de la mayoría de los oocitos, lo que confirma que la sobreexpresión y activación de p38 γ induce la progresión meiótica, tal como se ha descrito por otros autores (Perdiguero *et al.*, 2003).

A continuación, se trataron los oocitos microinyectados con sorbitol (300 mM) y se analizó la salida de citocromo c y la actividad caspasa-3 1 h y 3 h después del tratamiento. En los oocitos tratados con sorbitol durante una 1 h, la expresión de MKK6-DD y p38 β , p38 δ , o p38 γ inhibe la activación de caspasa-3 (Fig. 28B y E) y la salida de citocromo c (Fig. 28H) inducidas por MKK6-DD, mientras que la expresión de MKK6-DD y p38 α no varía la aceleración de la apoptosis inducida por MKK6-DD (Fig. 28B y H). Después de 3 h del tratamiento con sorbitol, no se encontró ningún cambio significativo entre las distintas combinaciones, pues todos los oocitos presentaban una actividad caspasa-3 elevada (Fig. 28C y F) y una salida masiva de citocromo c (Fig. 28I).

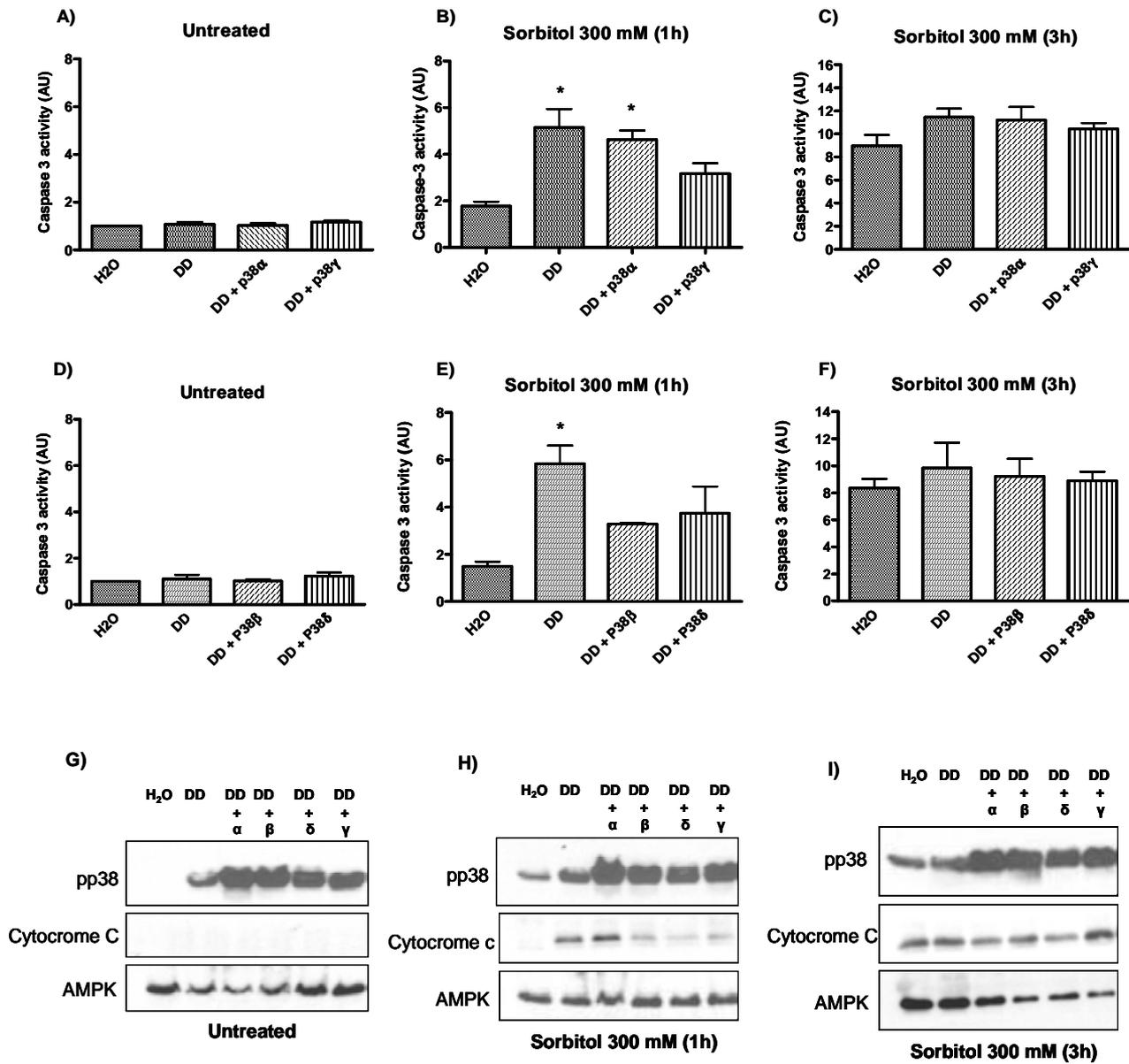


Figura 28. La expresión de MKK6-DD y p38 β , γ o δ inhibe la aceleración de la caspasa-3 y la salida de citocromo c inducida por MKK6-DD. (A, D) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MKK6-DD, MKK6-DD con p38 α , β , γ o δ , y 18 h después se determinó la actividad caspasa-3. (G) Se determinarán los niveles de pp38, citocromo c y AMPK (control de carga) en extractos citosólicos por Western blot. (B, C, E, F, H, I) Los oocitos inyectados con los mRNAs e incubados durante 18 h se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h y se determinó la actividad caspasa-3 y la salida de citocromo c como se ha descrito anteriormente. Los resultados de la actividad caspasa-3 se representan como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes en los paneles A, B, C, y de 3 experimentos independientes en los paneles D, E, F, que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos microinyectados con los mRNAs con los oocitos inyectados con agua. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). Los Western blot mostrados son de un experimento representativo.

3.4. La expresión de un constitutivo activo de p38 β acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

Para estudiar con más detalle cuál de las isoformas de p38 es, o son responsables, de la aceleración de la apoptosis inducida por MKK6-DD ante el shock hiperosmótico, expresamos los constitutivos activos de p38 α , (que tiene substituidos los aminoácidos Asp-177 y Phe-328 por Ala y Ser respectivamente), p38 β (substitución del aminoácido Asp-176 por Ala), p38 δ (Asp-176 por Ala), y p38 γ (Asp-179 por Ala). Se ha descrito que estas mutaciones en p38 pueden actuar como constitutivos activos (Askari *et al.*, 2009; Avitzour *et al.*, 2007). Se añadió una secuencia myc de 13 aminoácidos en el extremo N-terminal de las distintas isoformas para controlar los niveles de expresión por Western blot. Como control positivo de la aceleración de la apoptosis se microinyectaron los oocitos con el constitutivo activo de MKK6 (MKK6-DD).

Como puede observarse en la figura 29B, los constitutivos activos de las diferentes isoformas de p38 se expresan de forma eficiente en los oocitos microinyectados con sus respectivos mRNAs. Asimismo, la expresión de los constitutivos activos de p38 α y p38 β , aumenta la fosforilación de p38 respecto a los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 29B), mientras que no tienen ningún efecto en la actividad caspasa-3 (Fig. 29A) y en la salida de citocromo c (Fig. 29B). Estos resultados indican que la activación sostenida de una de las isoformas de p38 no es suficiente para inducir la apoptosis en los oocitos de *Xenopus*. El tratamiento de los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 1 h induce un aumento estadísticamente significativo de la actividad caspasa-3 en los oocitos inyectados con el constitutivo activo de p38 β (Fig. 29C), que se correlaciona con una salida temprana de citocromo c (Fig. 29D). Como control positivo, MKK6-DD induce un claro incremento de la actividad caspasa-3 respecto a los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 29C). La fosforilación de p38 1 h después del tratamiento con sorbitol se encuentra muy elevada en los oocitos que expresan la isoforma β , medianamente elevada para las isoformas α y δ , y ligeramente incrementada en p38 γ (Fig. 29D).

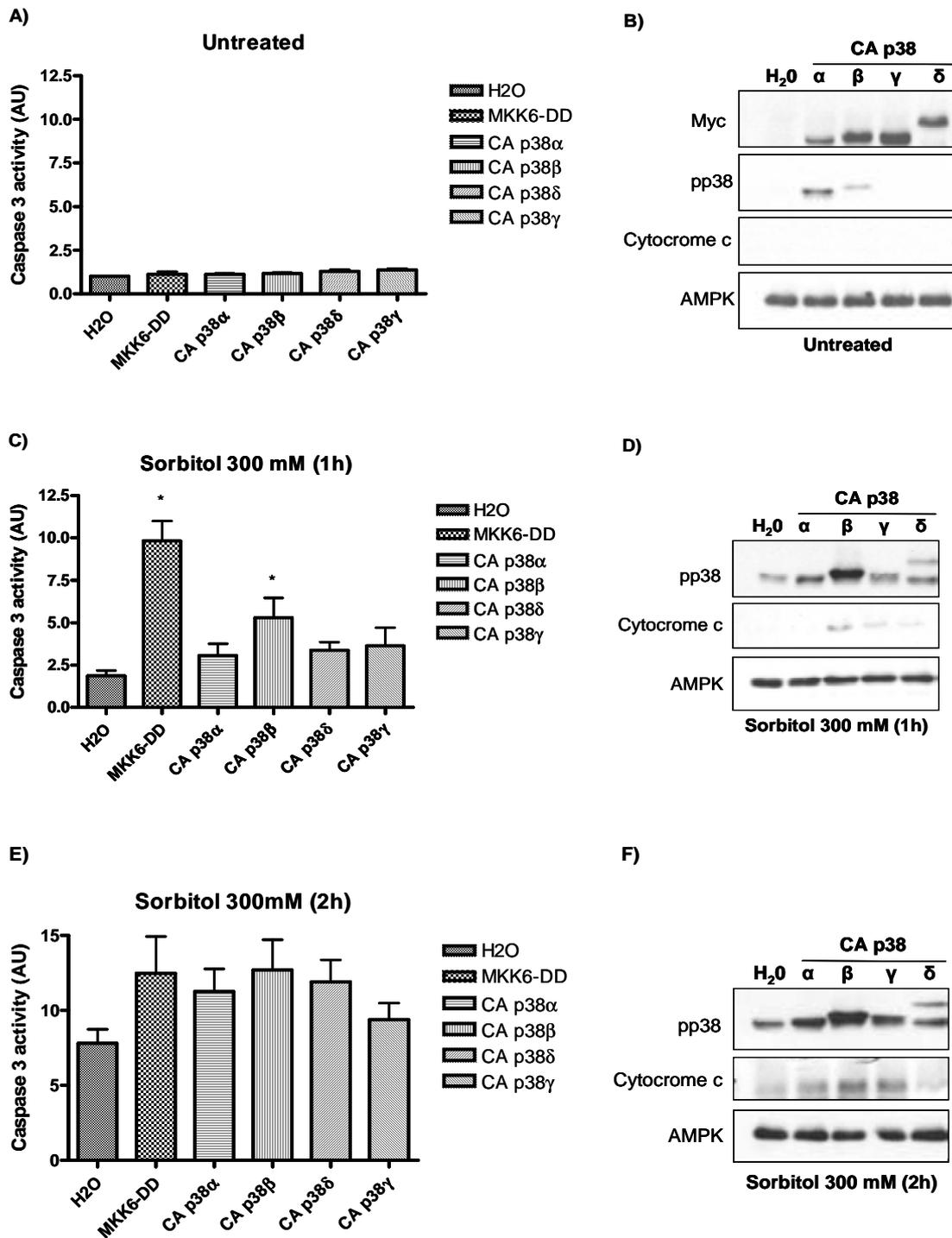


Figura 29. La expresión de un constitutivo activo de p38 β acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs de los constitutivos activos (CA) de p38 α , p38 β , p38 γ , o p38 δ y 18 h después se determinó la actividad caspasa-3. (B) Se analizó la salida de citocromo c en extractos citosólicos, la expresión de los diferentes mRNAs inyectados (myc), la fosforilación de p38, y los niveles de AMPK (control de carga) mediante Western blot. (C, D, E, F) Los oocitos inyectados con los mRNAs se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 3 h y se determinó la actividad caspasa-3 y la salida de citocromo c como se ha descrito anteriormente. Los resultados de la actividad caspasa-3 en los paneles A, C, E representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con los distintos mRNAs con los inyectados con H₂O. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). Los Western blot mostrados son de un experimento representativo.

Cuando analizamos la apoptosis después de 2 h del tratamiento con sorbitol, no se observa ningún cambio estadísticamente significativo en la actividad caspasa-3 en las distintas condiciones, aunque los oocitos que expresan constitutivos activos presentan valores más altos que los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 29E). También se aprecia una mayor salida de citocromo c en los oocitos que expresan los constitutivos activos de p38 α , β o γ (sobre todo en p38 β) respecto a los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 29F).

En conjunto, estos resultados sugieren que, de las distintas isoformas de p38, la isoforma β tiene un papel más pro-apoptótico que el resto de isoformas en el estrés inducido por el shock hiperosmótico.

4. Papel de la vía de señalización de JNK en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

4.1. La expresión de un constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

En una primera aproximación para estudiar el papel regulador de la vía de señalización de JNK en la apoptosis inducida por el shock osmótico con sorbitol, hemos expresado un constitutivo activo de MEKK1 (proteína quinasa activadora de la vía de señalización de JNK, aunque también de p38 y ERK 1/2) que tiene delecionada la zona N-terminal (aminoácidos 1 a 351) que hemos denominado MEKK1+, y una quinasa catalíticamente inactiva de MEKK1+ que tiene substituido el aminoácido Lys-432 por Met (MEKK1-KM) (Minden *et al.*, 1994). La expresión de MEKK1+ en los oocitos no tratados induce la fosforilación de JNK y p38, mientras que la expresión del mutante inactivo MEKK1-KM no tiene ningún efecto en ambas vías de señalización, como era de esperar (Fig. 30B). Asimismo, la microinyección de ambos mutantes no induce la activación de caspasa-3 (Fig. 30A) ni la salida de citocromo c (Fig. 30B) respecto a los oocitos inyectados con H₂O. Cuando tratamos los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 1 h, MEKK1+ induce un aumento significativo de la actividad caspasa-3 en comparación con los oocitos inyectados con H₂O o con MEKK1-KM (Fig. 30A), y que se acompaña con la salida de citocromo c al citosol (Fig. 30B).

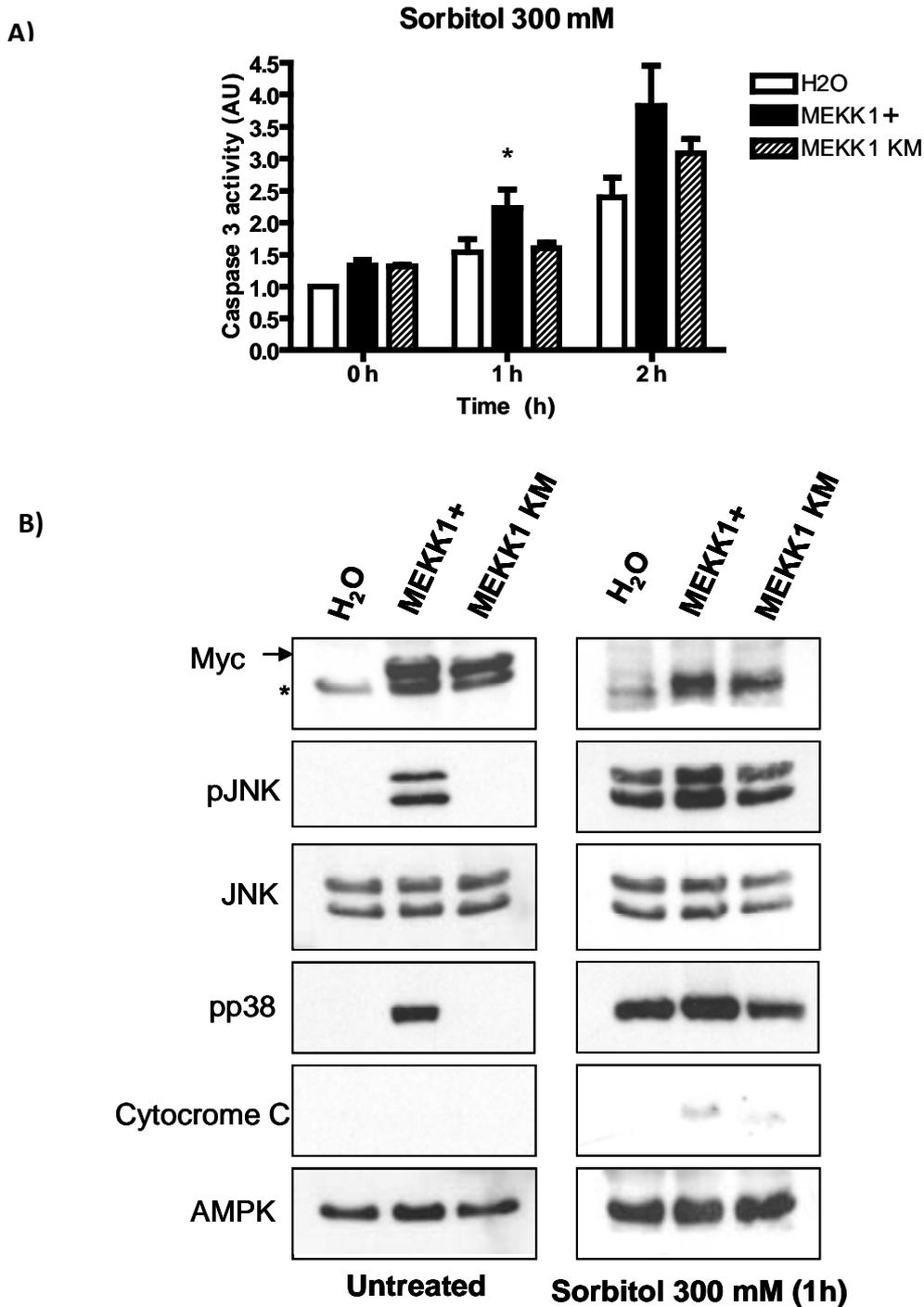


Figura 30. La expresión del constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MEKK1+ o MEKK1-KM o con 50 nl de H₂O como control, y 18 h después se obtuvieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 2 h y se determinó la actividad caspasa-3. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con los distintos mRNAs con los oocitos inyectados con agua. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de myc, pJNK, JNK, pp38, citocromo c y AMPK (control de carga). La flecha indica la expresión de MEKK1+ y MEKK-KM, que contienen myc en la región N-terminal. El asterisco (*) indica una proteína inespecífica detectada por el anticuerpo myc, que aparece muy cerca de la proteína MEKK1. El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

La aceleración de la apoptosis inducida por MEKK1+ es parcialmente inhibida por SP600125, y con mayor claridad por SB203580 y BIRB796, indicando que ambas vías de señalización (JNK y p38) regulan la apoptosis inducida por shock osmótico en los oocitos de *Xenopus* (Fig. 31).

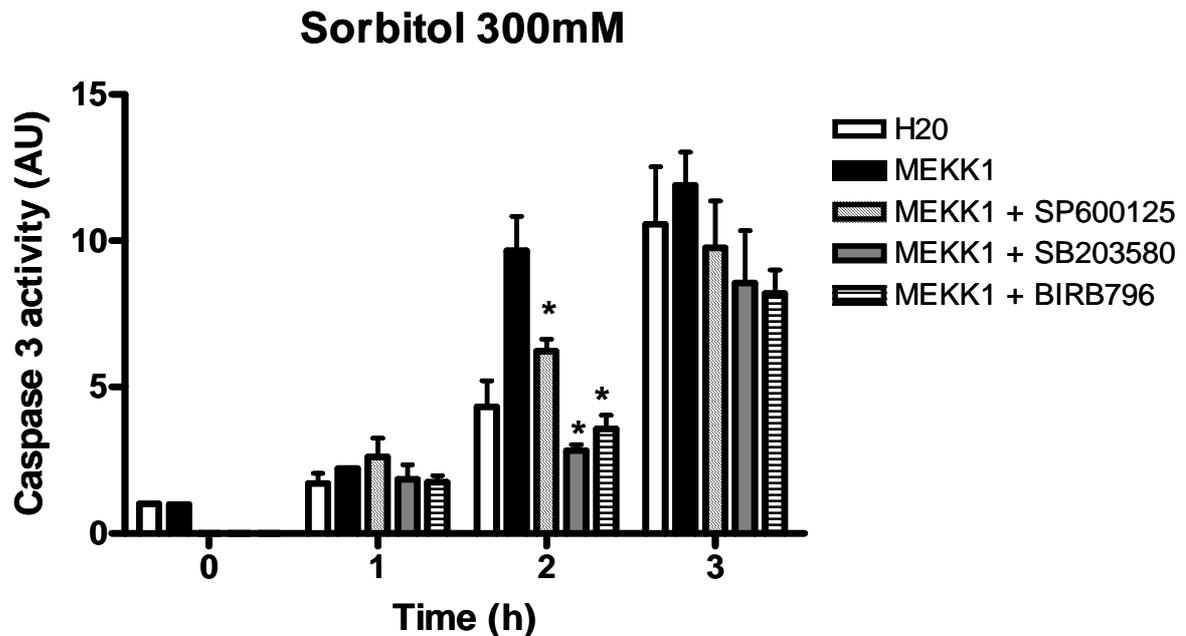


Figura 31. La aceleración de la apoptosis inducida por el constitutivo activo de MEKK1 es dependiente de las vías de señalización de JNK y p38. Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) del mRNA para MEKK1+ y se incubaron con SP600125 (100 μ M), SB203580 (100 μ M), o con BIRB796 (100 μ M) disueltos en MBS 1X durante 18 h. A continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores durante 3 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. Como control, algunos oocitos se inyectaron con 50 nl de H₂O. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con MEKK1 más inhibidores respecto a los inyectados con MEKK1+. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*).

4.2. JNK1-1 y JNK1-2 se activan durante el shock hiperosmótico con sorbitol

Para estudiar con más detalle el papel de las distintas isoformas de JNK en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, hemos clonado y expresado en los oocitos las isoformas salvajes de *Xenopus* JNK1-1 y JNK1-2, así como sus mutantes catalíticamente inactivos (JNK1-1-AF, JNK1-1-KR, JNK1-2-AF y JNK1-2-KR).

La diferencia entre JNK1-1 (384 aminoácidos) y JNK1-2 (426 aminoácidos) reside en el extremo C-terminal. Ambas isoformas se generan por splicing alternativo a partir de un

único gen (JNK1) dando lugar a una secuencia de aminoácidos distinta en el extremo C-terminal.

Todas las isoformas tienen un epitopo myc en el extremo amino-terminal que permiten ser detectadas por Western blot con el anticuerpo correspondiente. Las isoformas JNK1-1 (40 kDa), JNK1-2 (49 kDa) y los mutantes inactivos (AF y KR) se expresaron bien en los oocitos inyectados con sus respectivos mRNAs y no presentaron fosforilación en los oocitos sin tratar (Fig. 32B). Por otro lado, la co-expresión del constitutivo activo MEKK1+ con JNK1-1 o JNK1-2 aumentó los niveles de fosforilación de estas isoformas junto con las JNK endógenas (Fig. 32B), pero no incrementó la actividad caspasa-3 (Fig. 32A) ni la salida de citocromo c (Fig. 32B).

La expresión de JNK1-1 o JNK1-2 en los oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 2 h aumentó la actividad caspasa-3 respecto a los oocitos inyectados con H₂O o los que expresaban los mutantes JNK1-1-AF, JNK1-2-AF o JNK1-2-KR, aunque no fue estadísticamente significativa (Fig. 32E). No se observó ningún efecto en la salida de citocromo c en los oocitos que expresan las formas salvajes o mutantes de JNK1-1 o JNK1-2 con respecto a los oocitos inyectados con H₂O, a excepción del mutante JNK1-1-KR que presentó un incremento de citocromo c (Fig. 32F). La actividad caspasa-3 en los oocitos que expresaron este mutante también fue ligeramente superior al resto de mutantes de JNK1-1 o JNK1-2, alcanzado un nivel similar al de los oocitos que expresaron las formas salvajes JNK1-1 y JNK1-2 (Fig. 32E). La expresión conjunta de MEKK1+ y JNK1-1 o JNK1-2 incrementó significativamente la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico (Fig. 32E y F). Es más, 1 h después del tratamiento con sorbitol ya se observó una salida significativa de citocromo c en los oocitos que expresaron MEKK1+ con JNK1-1 o JNK1-2 (Fig. 32C y D). Como ya se indicó anteriormente, este efecto también se observó al expresar únicamente MEKK1+ (Fig. 30).

En conjunto, los datos anteriores demuestran que JNK1-1 y JNK1-2 se fosforilan durante el shock hiperosmótico, y sugieren que ambas isoformas contribuyen ligeramente a la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.

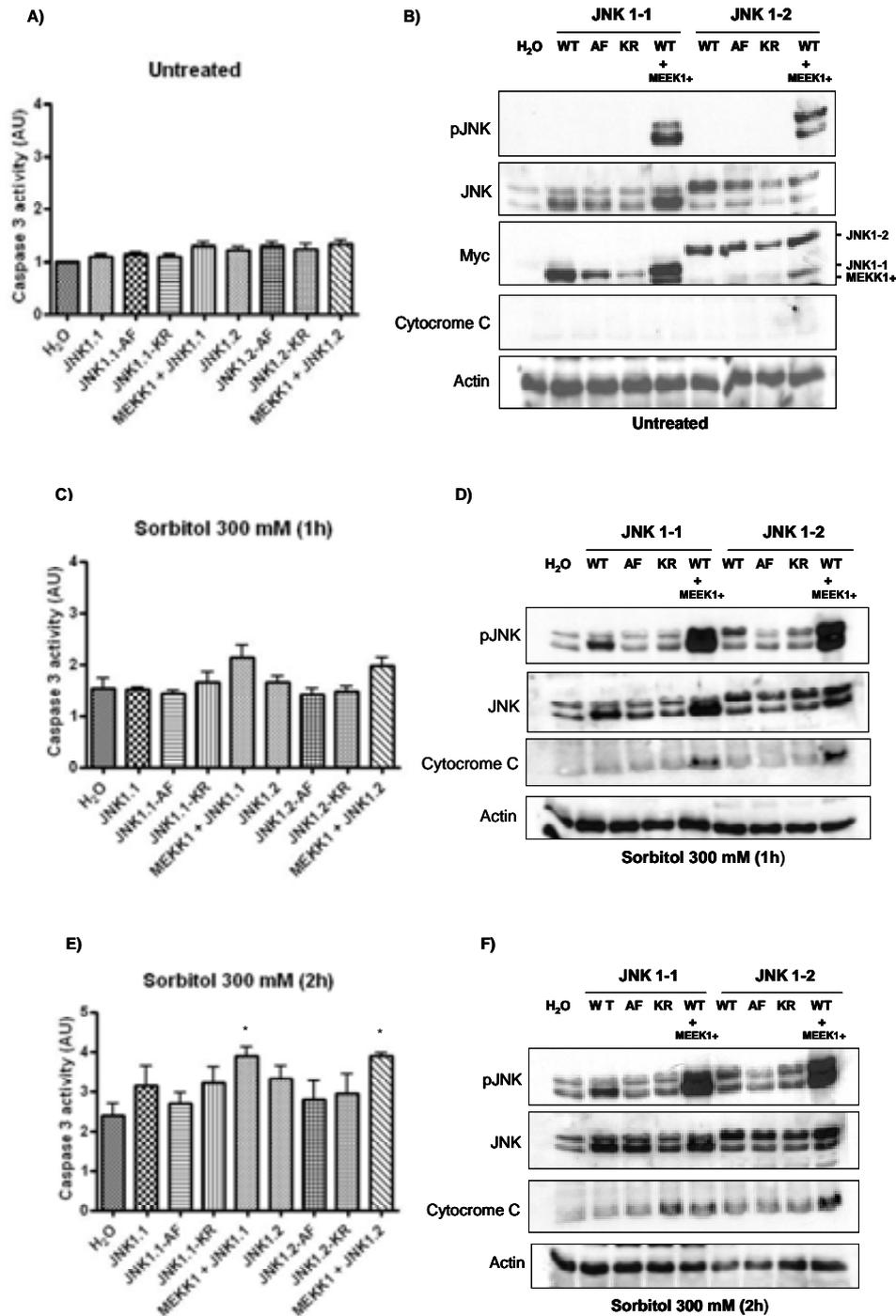


Figura 32. JNK1-1 y JNK1-2 se activan durante el shock hiperosmótico con sorbitol, incrementando ligeramente la actividad caspasa-3. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MEKK1+, JNK1-1, JNK1-1-AF, JNK1-1KR, JNK1-2, JNK1-2-AF, JNK1-2-KR, y las combinaciones MEKK1+ con JNK1-1 y MEKK1+ con JNK1-2, y 18 h después se determinó la actividad caspasa-3. (B) Se cuantificaron los niveles de pJNK, JNK, citocromo c, myc y actina (control de carga) en extractos citosólicos por Western blot. (C, D, E, F) Los oocitos inyectados con los mRNAs e incubados durante 18 h se trataron con sorbitol (300 mM) durante 1 h y 2 h y se determinó la actividad caspasa-3 y la salida de citocromo c como se ha descrito previamente. Los resultados de la actividad caspasa-3 en los paneles A, C, E representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con los distintos mRNAs con los oocitos inyectados con H₂O. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). Los Western blot mostrados son de un experimento representativo.

4.3. La expresión de un constitutivo activo de MKK7 junto con las isoformas JNK1-1 y JNK1-2 incrementa la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

La expresión de un constitutivo activo de MEKK1 tiene el inconveniente de que también activa las vías de señalización de p38 (Fig.30B) y ERK 1/2 (datos no mostrados).

Para estudiar más específicamente el papel de la vía de JNK en la apoptosis inducida por shock osmótico, hemos clonado MKK7 (quinasa activadora específica de JNK) de *Xenopus laevis*, y mutado los aminoácidos Ser-268, Thr-272 y Ser-274 por Asp, Glu y Asp respectivamente (MKK7-DED), y que se ha descrito previamente funciona como un constitutivo activo de MKK7 (Yamanaka *et al.*, 2002). Asimismo, generamos un mutante de MKK7 sin actividad catalítica (MKK7-KM) que tiene substituido el aminoácido Lys-146 por Met (Holtmann *et al.*, 1999). La expresión del constitutivo activo MKK7-DED activó la vía de señalización de JNK pero no la de p38, mientras que la expresión del mutante inactivo MKK7-KM no activó ninguna de estas vías de señalización, como se esperaba (Fig. 33).

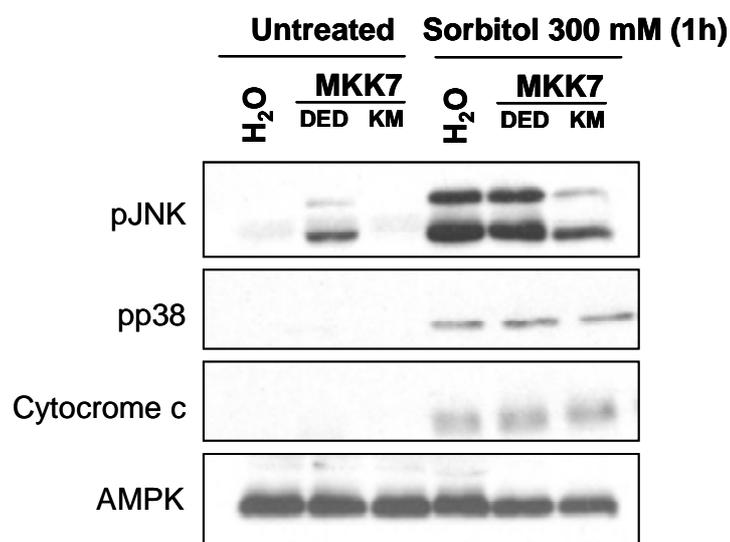


Figura 33. Activación de la vía de JNK con la expresión del constitutivo activo de MKK7 en oocitos de *Xenopus*. Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MKK7-DED y MKK7-KM. 18 h después se obtuvieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 1 h y se determinaron los niveles de pJNK, pp38, citocromo c y AMPK (control de carga) por Western bloó. Como control, algunos oocitos se inyectaron con 50 nl de H₂O y se trataron con sorbitol como se ha descrito anteriormente. El Western blot mostrado corresponde a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

El tratamiento con sorbitol incrementó por igual la fosforilación de JNK en los oocitos inyectados con H₂O y en los que expresaban el constitutivo activo de MKK7. Sin embargo, la expresión de MKK7-KM redujo la fosforilación de JNK inducida por el shock hiperosmótico (Fig. 33). La expresión de MKK7-DED y MKK7-KM no alteró la salida de citocromo c en los oocitos tratados con sorbitol durante 1 h al compararlos con los oocitos inyectados con H₂O (Fig. 33).

A continuación, se microinyectaron los oocitos con los mRNAs correspondientes al constitutivo activo MKK7-DED, JNK1-1, JNK1-2 y la combinación de MKK7-DED con JNK1-1 o JNK1-2 y se determinaron los niveles de actividad caspasa-3 y la salida de citocromo c, comparándolos con los oocitos inyectados con H₂O. Los oocitos no tratados expresaron bien las distintas proteínas, pero no mostraron ningún cambio significativo en la actividad caspasa-3 (Fig. 34A) y en la salida de citocromo c (Fig. 34B) respecto a los oocitos inyectados con agua. La expresión de MKK7-DED incrementó la fosforilación de las JNK endógenas, tal como se ha descrito previamente, mientras que la expresión conjunta del constitutivo activo MKK7-DED con JNK1-1 o JNK1-2 aumentó los niveles de fosforilación de JNK1-1 y JNK1-2, respectivamente (Fig. 34B). La expresión de MKK7-DED en los oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante 1 h incrementó la actividad caspasa-3 respecto a los oocitos inyectados con H₂O, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 34A) y no tuvo ningún efecto en la salida de citocromo c, siendo muy ligera tanto en los oocitos que expresaban MKK7-DED como en los inyectados con H₂O (Fig. 34B). La co-expresión de MKK7-DED con JNK1-1 o JNK1-2 aumentó los niveles de actividad caspasa-3 después de 1 h de tratamiento con sorbitol respecto a los oocitos inyectados con H₂O o los que expresaron únicamente MKK7-DED, aunque las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Fig. 34A). Este incremento de la actividad caspasa-3 se correlacionó con un aumento de la salida de citocromo c y de la forma proteolizada de caspasa-3 detectada por Western blot (Fig. 34B). Estos resultados indican que la activación sostenida de JNK1-1 y JNK1-2 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, aunque los resultados de actividad enzimática para caspasa-3 no fueron estadísticamente significativos.

Como se observa en la figura 34A, 2 y 3 h después del tratamiento con sorbitol los oocitos inyectados con H₂O presentaron una elevada actividad caspasa-3, pero los niveles fueron mayores en los oocitos que expresaron MKK7-DED, JNK1-1, JNK1-2 o combinaciones de ambos

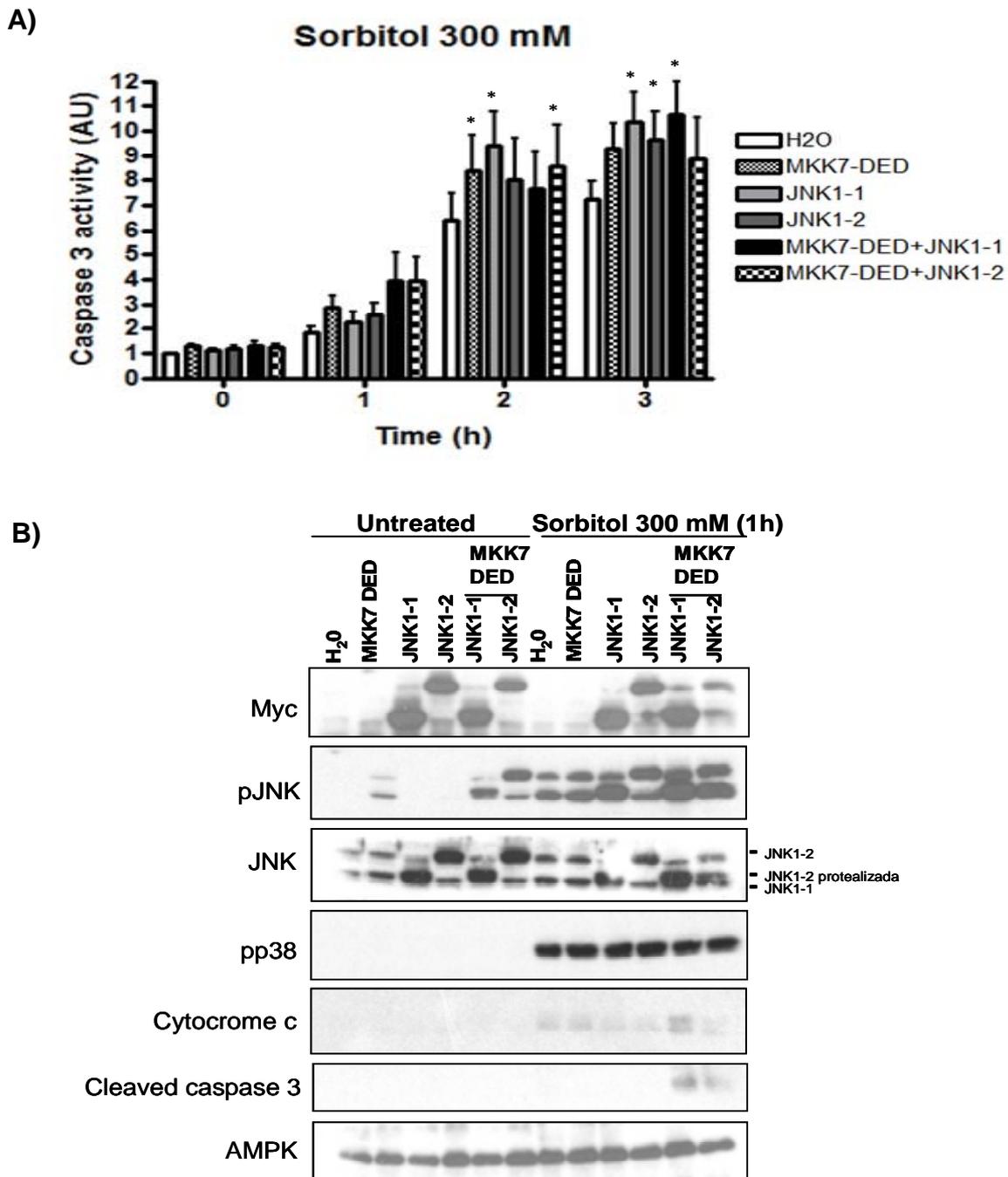


Figura 34. La expresión combinada del constitutivo activo de MKK7 y JNK1-1 o JNK1-2 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl (5ng) de los mRNAs para MKK7-DED, JNK1-1, JNK1-2 y las combinaciones MKK7-DED + JNK1-1 y MKK7-DED + JNK1-2 y 18 h después se obtuvieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. Como control se inyectaron oocitos con 50 nl de H₂O y se trataron con sorbitol como se ha descrito anteriormente. Los resultados son la media \pm SEM de 4 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos inyectados con los distintos mRNAs con los oocitos inyectados con H₂O. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de pJNK, JNK, pp38 citocromo c, caspasa-3 proteólizada, myc y AMPK (control de carga) en extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (300 mM) durante una 1 h. El Western blot mostrado es de un experimento representativo. La banda correspondiente a JNK1-2 proteólizada se obtiene como consecuencia de la activación de la caspasa-3 (datos no mostrados).

5. Papel de Smac/DIABLO y la activación de calpaínas en la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico

Como ya vimos anteriormente, la activación sostenida de la isoforma endógena de p38 β o bien la activación sostenida de las isoformas endógenas de JNK1-1 o JNK1-2 aceleran la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Estos resultados indican claramente que p38 β , JNK1-1 y JNK1-2 participan en la regulación de la apoptosis inducida por shock hiperosmótico en oocitos de *Xenopus*. Al mismo tiempo, ya que la muerte celular no es completamente bloqueada por los inhibidores de ambas vías de señalización (p38 y JNK) (Fig. 21), deben existir otros mecanismos adicionales, independientes de la activación de proteínas quinasas, involucrados en la regulación de la apoptosis inducida por el shock osmótico.

5.1. El shock hiperosmótico induce la salida rápida de Smac/DIABLO y la activación de calpaínas

Se realizaron varios experimentos de "time course" para analizar los niveles citosólicos de Smac/DIABLO y citocromo c en los oocitos de *Xenopus* tratados con sorbitol 300 mM. El shock osmótico indujo de forma rápida (5 min) y acumulativa la salida de Smac/DIABLO mitocondrial, mientras que solo se observó un incremento significativo de la salida de citocromo c entre 2 y 4 h (Fig. 35B). La salida masiva de citocromo c se correlacionó bien con la activación de caspasa-3 detectada tanto por Western blot (Fig. 35B) como por el ensayo enzimático (Fig. 35A).

Confirmamos la salida temprana de Smac/DIABLO y la salida tardía de citocromo c desde la mitocondria al citosol durante el shock hiperosmótico analizando los niveles de estas proteínas en fracciones citosólicas y mitocondriales (Fig. 36). Puesto que Smac/DIABLO es un inhibidor de las IAPs (ver Introducción apartado 2.4), estos resultados sugieren que la salida temprana de Smac/DIABLO podría sensibilizar al oocito reduciendo los niveles umbrales de citocromo c citosólicos que son necesarios para la activación posterior de caspasas. Esta disminución del nivel umbral inducida por Smac/DIABLO favoreciendo la apoptosis ha sido previamente descrita en los oocitos de *Xenopus* por otros autores (Johnson *et al.*, 2010).

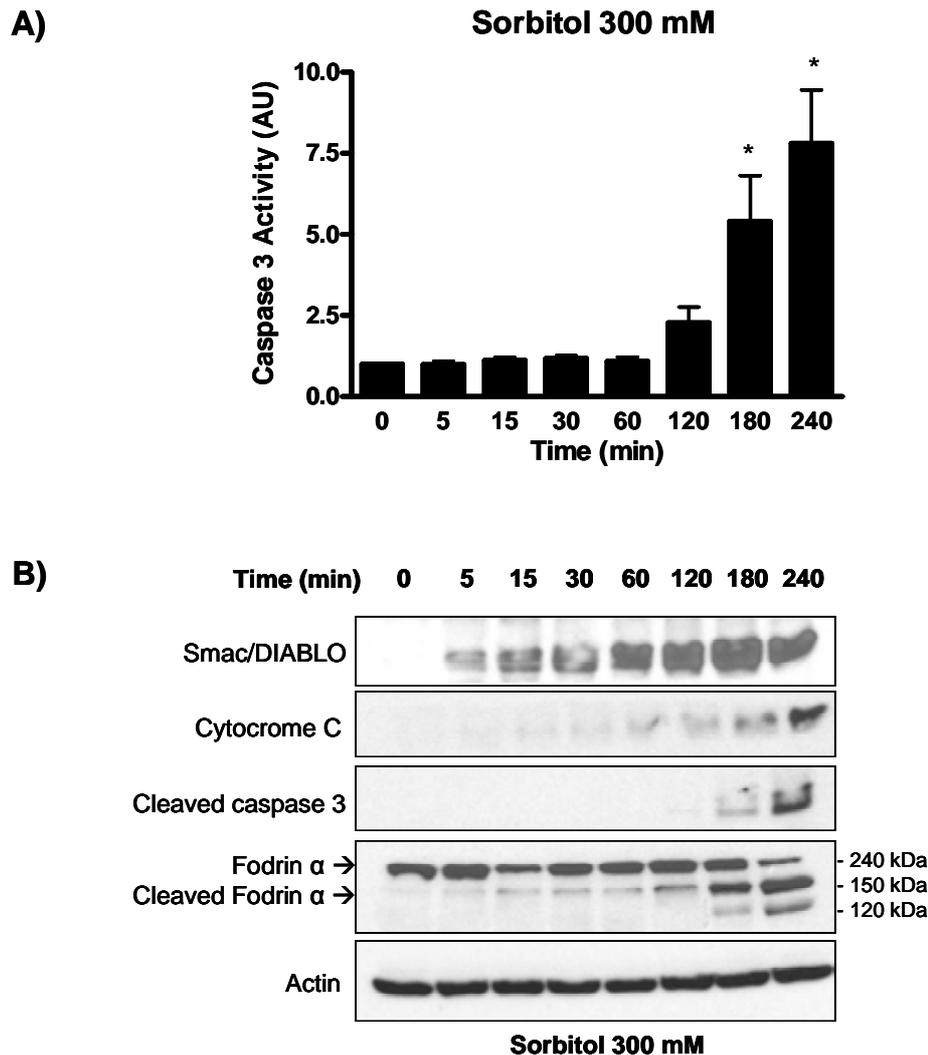


Figura 22. “Time course” de la salida de Smac/DIABLO, citocromo c, activación de calpaínas, y activación de caspasa-3 en respuesta al shock hiperosmótico. (A) Se trataron los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 4 h, se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. Los resultados son la media \pm SEM de 5 experimentos independientes que se analizaron con ANOVA seguido por el test de Dunnett comparando los oocitos tratados con los oocitos sin tratar (t=0). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos (*). (B) Se cuantificaron por Western blot los niveles de Smac/DIABLO, citocromo c, caspasa-3 proteólizada, fodrina α y actina (control de carga). El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

Para determinar la actividad calpaína en los oocitos tratados con sorbitol se analizaron por Western blot los niveles de fodrina α , un sustrato de calpaínas. La fodrina α (286 kDa, pero con un peso molecular aparente de 240 kDa en Western blot), es proteólizada por calpaínas generando dos fragmentos de 145 y 150 kDa (Czogalla and Sikorski, 2005; Wang, 2000b; Zhang *et al.*, 2009b). La fodrina α también puede ser proteólizada por caspasa-3 generando fragmentos de 150 y 120 kDa (Ulbricht *et al.*, 2003; Vanags *et al.*, 1996).

El shock hiperosmótico provocó una activación rápida de calpaínas entre 5 – 15 min (Fig. 35B) (los fragmentos de 145 y 150 kDa no pueden resolverse bien en el gel y aparecen como una sola banda) y un incremento más marcado de la actividad a partir de 2 h. Por otro lado, la aparición de una banda de 120 kDa a partir de las 3 h indica que la caspasa-3 proteóliza la fodrina α a tiempos largos (Fig. 35B).

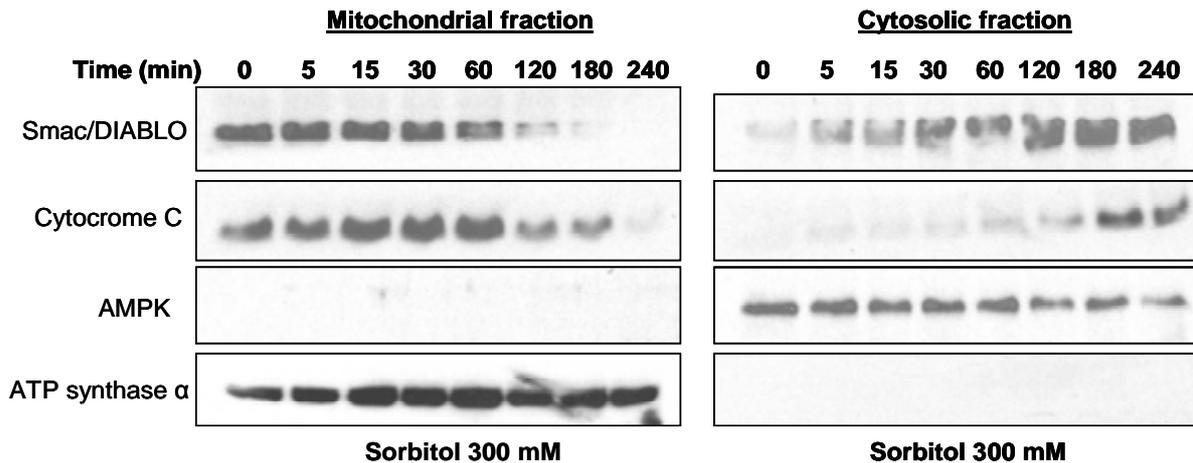


Figura 36. “Time course” de la salida de Smac/DIABLO y citocromo c en las fracciones mitocondrial y citosólica en respuesta al shock hiperosmótico. Se trataron los oocitos con sorbitol (300 mM) durante 4 h y se recogieron “pools” de 30 oocitos a distintos tiempos y se procedió a su fraccionamiento subcelular mediante centrifugación. Se cuantificaron por Western blot los niveles de Smac/DIABLO y citocromo c. Como marcador mitocondrial se cuantificaron los niveles de ATP sintasa α y como marcador citosólico se analizaron los niveles de AMPK. El Western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

Puesto que la activación de calpaínas es dependiente de los niveles de Ca^{2+} (Lopatniuk *et al.*, 2011), hemos analizado el efecto de un quelante de calcio en la proteólisis de fodrina α . La microinyección de EGTA en los oocitos (concentración intracelular 0,5 mM) inhibe la proteólisis de fodrina α inducida por el shock hiperosmótico hasta las 2 h, pero esta inhibición no se mantiene a las 3 h, cuando la actividad caspasa-3 es elevada (Fig. 37). Estos resultados confirman que la proteólisis inicial de la fodrina α inducida por el shock osmótico es dependiente de calpaínas, mientras que la proteólisis tardía es dependiente de caspasa-3. De esta forma, los oocitos incubados con sorbitol durante 4 h en presencia del inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk muestran una reducción significativa en la proteólisis de fodrina α , y una desaparición completa de la banda de 120 kDa, específica de la proteólisis inducida por caspasa-3 (Fig. 38).

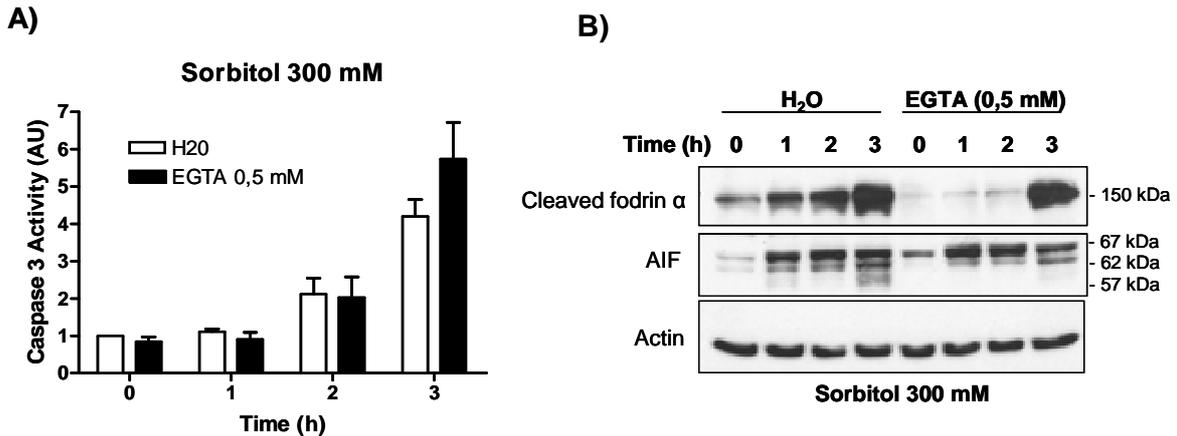


Figura 37. La inyección de EGTA inhibe la proteólisis de fodrina α inducida por el shock hiperosmótico. (A) Se inyectaron los oocitos con 50 nl del quelante de Ca^{2+} EGTA a una concentración final en el oocito de 0,5 mM. Como control de inyección, se inyectaron los oocitos con 50 nl de H_2O . Después de la inyección se trataron los oocitos con sorbitol (300 mM) y se obtuvieron extractos citosólicos a distintos tiempos. Para determinar la actividad caspasa-3. Los resultados son la media \pm SEM de 4 experimentos independientes que se analizaron con el Test-t de student (muestras apreadas) comparando la actividad caspasa-3 de los oocitos inyectados con EGTA con los inyectados con H_2O . (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de fodrina α , AIF y actina (control de carga). El Western blot mostrado es de un experimento representativo.

Otro marcador que se ha utilizado normalmente como sustrato de calpaínas es la proteína AIF, que se encuentra anclada en la membrana mitocondrial interna o bien unida débilmente a la membrana mitocondrial externa (Otera et al., 2005) y que puede ser liberada al citosol ante diversos estímulos pro-apoptóticos. Se ha descrito que la forma anclada en la membrana mitocondrial interna (62 kDa), cuando es proteólizada por calpaínas, da lugar a una forma de 57 kDa (tAIF) que es liberada al citosol (Delavallee et al., 2011; Norberg et al., 2010).

Como puede observarse en la figura 37B, el shock osmótico con sorbitol provocó un incremento en los niveles de AIF (67 y 62 kDa) en el citosol y la aparición de una forma de 57 kDa (tAIF) 1 h después del tratamiento, siendo más evidente a las 3 h del tratamiento (Fig. 37B, oocitos inyectados con H_2O). La microinyección con EGTA en los oocitos inhibió la activación de calpaínas inducida por el shock hiperosmótico y bloqueó la aparición de la forma truncada tAIF de 57 kDa (Fig. 37B) confirmando que AIF es un sustrato de las calpaínas.

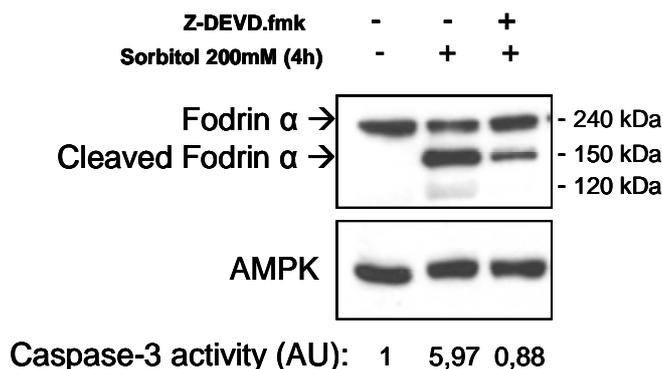


Figura 38. El inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk inhibe la proteólisis de la fodrina α . Se pre-incubaron los oocitos con Z-DEVD.fmk (50 μ M) disuelto en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (200 mM) en presencia del inhibidor durante 4 h. Se recogieron extractos citosólicos de oocitos no tratados y de oocitos tratados con sorbitol (200 mM) durante 4 h en presencia o en ausencia del inhibidor y se determinó la actividad caspasa-3. Se cuantificó por Western blot los niveles de fodrina α y AMPK (control de carga). La actividad caspasa-3 y el Western blot mostrado corresponde a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

5.2. La inhibición de calpaínas reduce la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3

A continuación, hemos determinado en un experimento de "time course" la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 en oocitos tratados con sorbitol 300 mM en presencia y en ausencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD.fmk y de los inhibidores de calpaínas ALLN y MDL28170. La activación de caspasa-3 inducida por el shock osmótico, que ocurre entre las 2 h y 4 h, se inhibe completamente con el inhibidor Z-VAD.fmk como era esperar, mientras que los inhibidores ALLN y MDL28170 inhiben la activación de caspasa-3 entre 2 y 3 h dependiendo del experimento considerado (Fig. 39A). Sin embargo, a las 4 h la actividad caspasa-3 volvió a ser elevada en presencia de ALLN o MDL28170. A continuación, analizamos por Western blot la salida de citocromo c en un experimento concreto (exp 2). La salida de citocromo c en los oocitos tratados con sorbitol se redujo significativamente a las 2 h en presencia del inhibidor ALLN (Fig. 39B). Tanto el inhibidor Z-VAD.fmk como el inhibidor MDL28170 inhibieron parcialmente la salida de citocromo c a las 2 h. Sin embargo, ninguno de los inhibidores fue capaz de disminuir la salida masiva de citocromo c a las 3 h de tratamiento con sorbitol (Fig. 39B). Como era de esperar, la proteólisis de fodrina α se inhibió con ALLN y MDL28170 a las 2 h y 3 h después del tratamiento con sorbitol, mientras que el Z-VAD.fmk solo inhibió parcialmente la proteólisis de fodrina α a las 3 h (Fig. 39B) debido, probablemente, a la inhibición de caspasa-3 (véase Fig. 38).

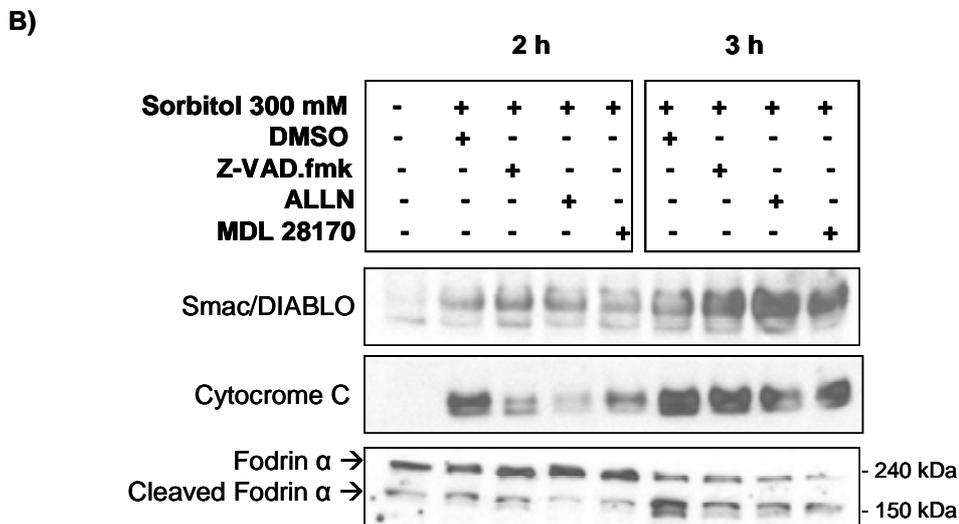
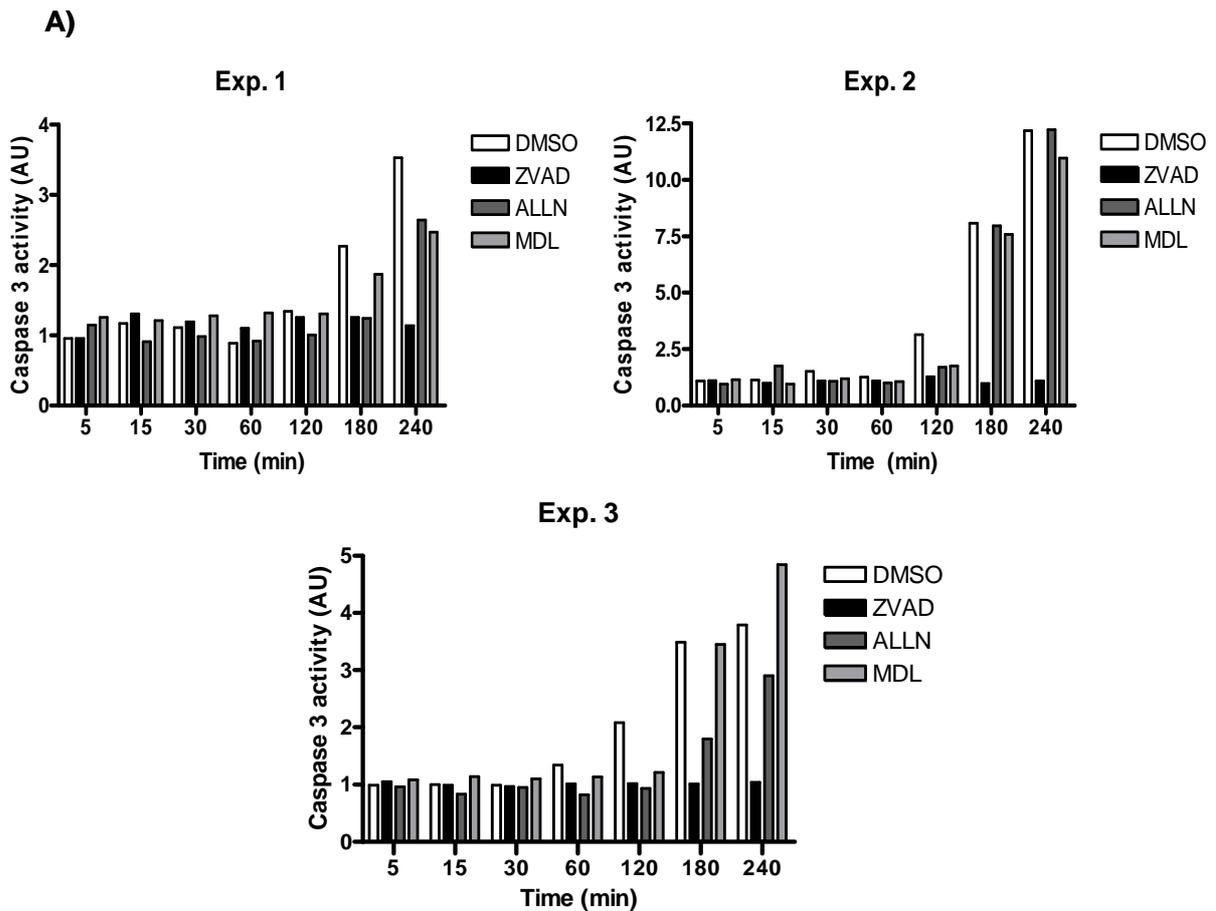


Figura 39. Los inhibidores de calpaínas retrasan la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock hiperosmótico. (A) Se pre-incubaron los oocitos con Z-VAD.fmk (100 μM), ALLN (100 μM) o con MDL28170 (100 μM) disueltos en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores durante 4 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. Como control se incubaron oocitos con sorbitol en presencia de DMSO (el disolvente utilizado para los inhibidores). Los resultados presentados son de 3 experimentos independientes (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de Smac/DIABLO, citocromo c y fodrina α en oocitos tratados con sorbitol 300 mM a las 2 h y 3 h en presencia y en ausencia de los inhibidores. El Western blot mostrado corresponde al experimento 2 del apartado anterior.

El efecto de Z-VAD.fmk en la inhibición de la salida de citocromo c es independiente de la caspasa-3, ya que el inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk no redujo la salida de citocromo c después de 2 y 3 h de tratamiento (Fig. 40). Se ha descrito que el inhibidor Z-VAD.fmk puede inhibir parcialmente las catepsinas (Rozman-Pungercar *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2008). No obstante, utilizando los inhibidores de catepsinas CA-074 y NSIT-CHO, que inhiben la catepsina B y la catepsina L respectivamente, no detectamos ningún efecto en la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducidas por el shock hiperosmótico (datos no mostrados). Es de destacar que los inhibidores utilizados no afectan a la liberación de Smac/DIABLO (Fig. 39B) ni a la fosforilación de p38 y JNK inducidas por el shock hiperosmótico (datos no mostrados). Otra posibilidad sería que Z-VAD.fmk inhibiera también las calpaínas. Sin embargo, como se observa en la figura 39B, la proteólisis de fodrina α no se inhibió en presencia de Z-VAD.fmk después 2 h de tratamiento con sorbitol.

Estos resultados sugieren que alguna caspasa, distinta a la caspasa-3, podría ser activada por el shock hiperosmótico y participan en la regulación de la salida de citocromo c mitocondrial.

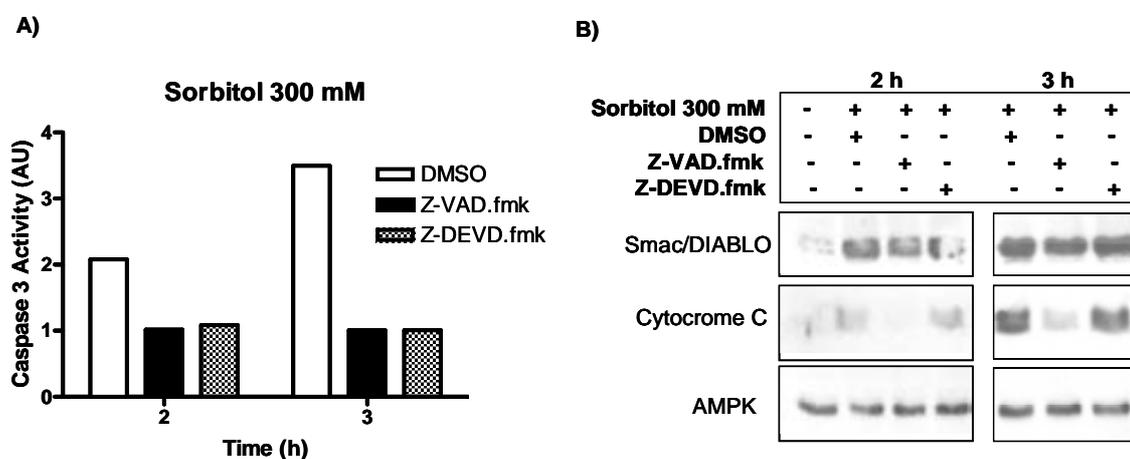


Figura 40. Z-VAD.fmk retrasa la salida de citocromo c inducida por shock hiperosmótico, pero no el inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk. (A) Se pre-incubaron los oocitos con Z-VAD.fmk (100 μ M), Z-DEVD.fmk (50 μ M) o DMSO (100 μ M) disueltos en MBS 1X durante 1 h y a continuación se incubaron con sorbitol (300 mM) en presencia de los inhibidores o DMSO durante 3 h. Se recogieron oocitos a distintos tiempos y se determinó la actividad caspasa-3. (B) Se cuantificó por Western blot los niveles de Smac/DIABLO, citocromo c y AMPK (control de carga) en oocitos tratados con sorbitol 300 mM durante 2 h y 3 h en presencia o ausencia de los inhibidores. La actividad caspasa-3 y el Western blot mostrado corresponde a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la figura 41, la microinyección de EGTA a una concentración final en el oocito de 0.5 mM retrasó la salida de citocromo c en los oocitos tratados con sorbitol respecto a los oocitos inyectados con H₂O (comparar 2 h de tratamiento), mientras que la salida de Smac/DIABLO y la activación de p38 y JNK no se vió afectada. Por otro lado, la inhibición simultanea de calpaínas y caspasa-3 microinyectando los oocitos con EGTA e incubándolos con el inhibidor Z-DEVD.fmk redujo marcadamente la salida de citocromo c inducida por el estrés osmótico a las 3 h (Fig. 41 ultimo carril). Estos resultados indican que las calpaínas regulan la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 y sugieren que diversos "feedback loops" positivos son activados por caspasa-3 acelerando el proceso de apoptosis (ver Discusión).

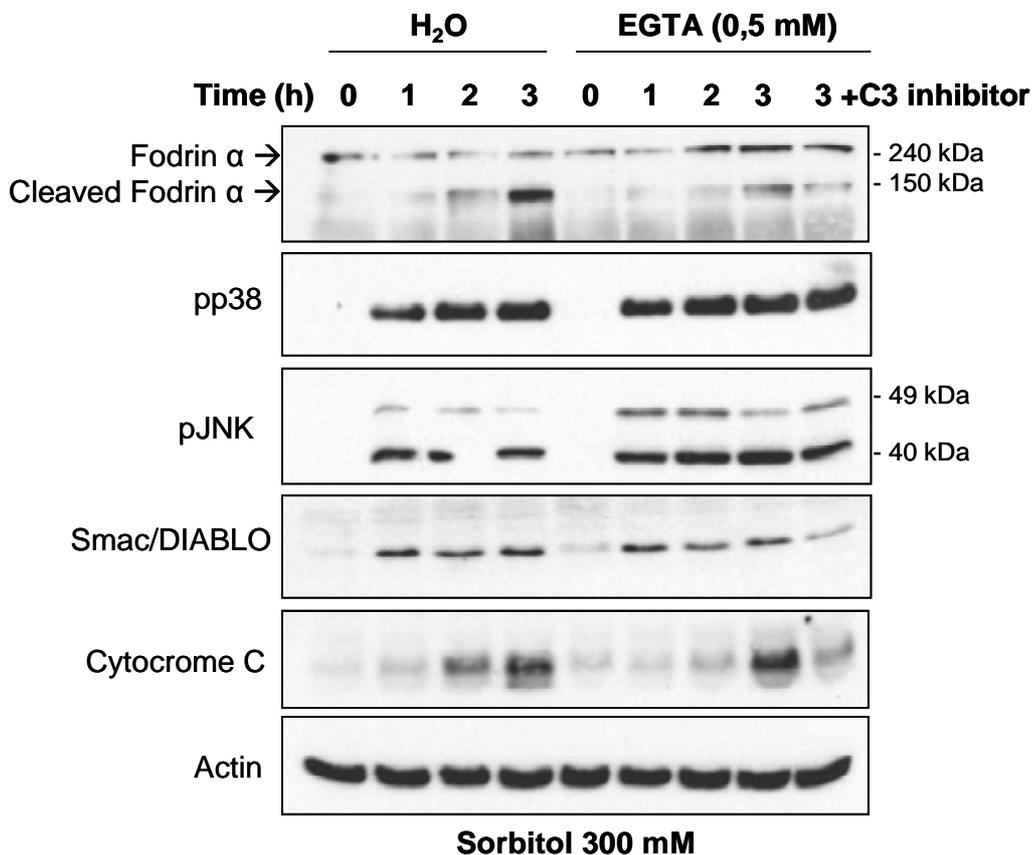


Figura 41. EGTA inhibe las calpaínas y retrasa la salida de citocromo c inducida por el shock hiperosmótico, mientras que la combinación de EGTA con el inhibidor específico de caspasa-3 (Z-DEVD.fmk) reduce marcadamente esta salida. Se inyectaron los oocitos con 50 nl del quelante de Ca²⁺ EGTA a una concentración final en el oocito de 0,5 mM. Como control, se inyectaron los oocitos con 50 nl de H₂O. Después de la inyección se trataron los oocitos con sorbitol (300 mM) y se obtuvieron extractos citosólicos a distintos tiempos en ausencia y en presencia del inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk (C3 inhibitor). Se cuantificó por Western blot los niveles de fodrina α, pp38, pJNK, Smac/DIABLO, citocromo c y actina (control de carga). El Western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

5.3 El bloqueo de Smac/DIABLO inyectando un anticuerpo específico inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3

La salida rápida de Smac/DIABLO mitocondrial inducida por el shock hiperosmótico (Fig. 35B) podría ser importante para regular la muerte del oocito. La presencia de Smac/DIABLO en el citosol puede facilitar la apoptosis de los oocitos mediante la inhibición de los inhibidores de caspasas (IAPs) varias horas antes de que se produzca la salida de citocromo c.

Como no se ha descrito ningún inhibidor específico de Smac/DIABLO, hemos analizado el papel de esta proteína en la apoptosis inducida por el shock osmótico mediante la microinyección de diferentes cantidades del anticuerpo contra Smac/DIABLO en oocitos de *Xenopus*. Como control negativo se microinyectó el anticuerpo anti-human IgG (Ref. 109-001-008 Jackson ImmunoResearch). La microinyección de 25 ng del anticuerpo contra Smac/DIABLO no tuvo ningún efecto significativo en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico al compararlo con los oocitos inyectados con anticuerpo control. Sin embargo, la microinyección de 50 ng de anticuerpo contra Smac/DIABLO (concentración final en el oocito 50 ng/ μ l) inhibió significativamente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 (medida por Western blot como forma proteólizada de caspasa-3) inducida por el shock hiperosmótico, pero no afectó a la actividad de las calpaínas medida como proteólisis de fodrina α (banda de 150 kDa) (Fig. 42). Se observó una clara disminución de la banda de 120 kDa de la fodrina α , resultante de su proteólisis por caspasa-3, confirmando que el anticuerpo contra Smac/DIABLO inhibe la caspasa-3.

Estos resultados indican que la salida temprana de Smac/DIABLO mitocondrial regula la salida tardía del citocromo c y reduce la activación de caspasa-3.

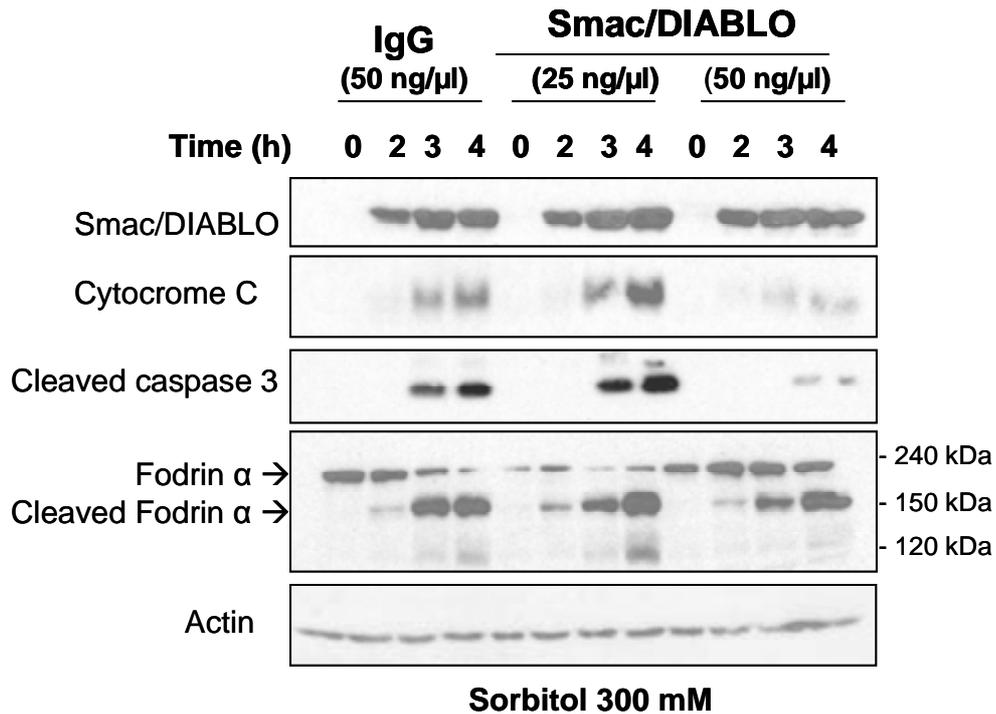


Figura 42. La inyección del anticuerpo contra Smac/DIABLO reduce la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducidas por el shock hiperosmótico. Se inyectaron los oocitos con 50 nl del anticuerpo contra Smac/DIABLO a distintas concentraciones (concentración final en el oocito de 25 ng/μl y 50 ng/μl). Como control de inyección, se inyectaron los oocitos con 50 nl del anticuerpo anti-Human IgG a una concentración final en el oocito de 50 ng/μl. A continuación, se trataron los oocitos con sorbitol (300 mM) y se obtuvieron extractos citosólicos a distintos tiempos para determinar los niveles de Smac/DIABLO, citocromo c, caspasa-3 proteólizada, fodrina α y actina (control de carga) por Western blot. El resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

VII) DISCUSIÓN

La presente tesis describe el papel de las proteínas quinasas de estrés p38 y JNK, así como la contribución de Smac/DIABLO y las calpaínas, en la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico con sorbitol en los oocitos de *Xenopus laevis*. Hasta la fecha no nos consta que existan publicaciones que demuestren la integración de estas vías en un único modelo celular de apoptosis inducida por estrés hiperosmótico. Por primera vez describimos que la activación sostenida de p38 β , JNK1-1 y JNK1-2 junto con la salida de Smac/DIABLO y la activación de las calpaínas, inducen la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 en los oocitos sometidos al estrés hiperosmótico. También estudiamos las propiedades básicas de la vía de señalización de p38 en respuesta al shock hiperosmótico con sorbitol en "pools" de oocitos, así como en oocitos individuales.

1. Propiedades básicas de la vía de señalización de p38

La apoptosis es un proceso biológico irreversible. Actuando como sensores e interruptores, las proteínas quinasas juegan un papel crítico en la regulación de las decisiones celulares (proliferación, diferenciación o muerte). Estos sensores celulares deben tener propiedades de señalización adecuadas para el procesamiento y propagación de los estímulos que dan lugar a los procesos irreversibles. Entre estas propiedades se incluyen: ultrasensibilidad (elevada activación después de superar un nivel umbral), histéresis (la respuesta no se mantiene cuando desaparece el estímulo) y respuesta digital (activación de todo o nada a nivel de célula individual). En los oocitos de *Xenopus*, JNK presenta ultrasensibilidad, histéresis y una respuesta digital ante el shock hiperosmótico (Bagowski *et al.*, 2001; Martiáñez *et al.*, 2009), mientras que la AMPK presenta ultrasensibilidad y respuesta digital, pero no histéresis (Martiáñez *et al.*, 2009). En nuestro modelo proponemos que otras proteínas quinasas, además de la AMPK y JNK, pueden ser importantes para iniciar la muerte del oocito inducida por shock hiperosmótico (López, 2010; Martiáñez *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican que p38 se activa por shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus* (Fig. 14), que tiene un comportamiento ultrasensible (Fig. 15); que no presenta histéresis (Fig. 16), y que la activación a nivel de célula individual es bimodal (Fig. 17).

La vía de señalización de p38 es altamente ultrasensible ($n_H \approx 14.4$) para el shock hiperosmótico con sorbitol (Fig. 15). Esto permite una activación rápida y elevada del sensor después de superar un nivel umbral, y revela la importancia de la vía de señalización de p38 como una respuesta primaria al estrés osmótico. La magnitud de la respuesta es más alta en comparación con los sistemas de señalización de JNK ($n_H \approx 8,8$) o

AMPK ($n_H \approx 5,3$) descritos anteriormente (Martiañez *et al.*, 2009). Como en los oocitos de *Xenopus* no hay actividad transcripcional, todos los efectos biológicos resultantes de la activación de p38 son independientes del genoma. Se ha descrito que la translocación nuclear de la proteína Hog1 (la proteína homóloga de p38 descrita en *Saccharomyces cerevisiae*) y sus efectos sobre la transcripción, no son necesarios para la resistencia al estrés hiperosmótico. Sin embargo, los enzimas necesarios para la producción de glicerol son esenciales para el mantenimiento del equilibrio osmótico y la viabilidad de la levadura (Westfall *et al.*, 2008). A nivel fisiológico, tiene sentido que la primera medida protectora en respuesta al estrés hiperosmótico actúe principalmente a través de efectos inmediatos sobre las proteínas existentes y que no dependa de procesos que requieren más tiempo, como la transcripción y la traducción.

El sistema de señalización de p38 es monoestable, lo que significa que cuando desaparece el estímulo la actividad se reduce marcadamente. Esto es similar al sistema de señalización de AMPK, y en contraste con la biestabilidad observada en el sistema de señalización de JNK, como se ha descrito anteriormente (Martiañez *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque la actividad de p38 se reduce de forma importante al desaparecer el estímulo, esta no llega a alcanzar el nivel basal (Fig. 16). La regulación negativa de p38 cuando desaparece el estímulo podría ser difícil si se ha liberado una cantidad significativa de citocromo c, ya que la activación de caspasa-3 puede inducir la fosforilación de p38 (Fig. 18). Este comportamiento diferencial (monoestable/ biestable) de las proteínas quinasas frente al mismo estímulo podría ser importante para la adaptación de las células al shock osmótico y para la regulación del programa de muerte celular. La combinación de sistemas monoestables (AMPK y p38) y biestables (JNK) puede ser útil para evaluar la potencia y la duración de un estímulo nocivo y establecer un punto de no retorno cuando se supera un nivel umbral (López, 2010). La duración de la fosforilación de p38 parece crucial para regular el destino celular. En levadura se requiere una regulación negativa de la señalización, mientras que la activación sostenida de Hog1 es perjudicial para el crecimiento celular (Maeda *et al.*, 1994).

La respuesta de p38 ante el shock osmótico con sorbitol en las células individuales es bimodal, en contraste con la respuesta de todo o nada descrita anteriormente para la AMPK y JNK (Martiañez *et al.*, 2009). Es importante tener en cuenta que tanto la respuesta bimodal como la respuesta de todo o nada de las proteínas quinasas es dependiente de tiempo, lo que significa que una baja y homogénea actividad inicial en las células individuales se convierte, al cabo de unas horas, en dos poblaciones celulares con distinta

actividad (Fig. 17). Este comportamiento podría reflejar la existencia de diferentes fases durante la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, y la presencia de diferentes “feedback loops” para las proteínas quinasas podría explicar la respuesta bimodal o la de todo o nada. Por ejemplo, la activación de p38 inducida por la liberación del citocromo c y la activación de caspasa-3 (Fig. 18) puede contribuir a la distribución bimodal observada.

2. p38 y JNK regulan la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

Se ha descrito que las proteínas quinasas de estrés p38 y JNK se activan durante la apoptosis, pero su papel en la regulación de la muerte celular es controvertido (Kyriakis and Avruch, 1996; Tourian, Jr. *et al.*, 2004). Se ha visto que p38 y JNK juegan un papel pro-apoptótico en algunos modelos celulares (Aoshiba *et al.*, 1999; Bae and Song, 2003; Vivo *et al.*, 2003; Yoshino *et al.*, 2001), mientras que tienen un papel anti-apoptótico en otros (Assefa *et al.*, 1999; Nemoto *et al.*, 1998; Porras *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002).

En este trabajo, se abordó el papel de p38 y JNK en la regulación de la apoptosis inducida por shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus laevis*.

Los compuestos SB203580 (inhibidor de p38 α/β), BIRB796 (inhibidor de p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) y SP600125 (inhibidor de JNK) no inhiben significativamente la apoptosis inducida por el shock osmótico en los oocitos de *Xenopus*. Se observó únicamente un pequeño aumento, estadísticamente significativo, de la actividad caspasa-3 1 h después del shock hiperosmótico con sorbitol en los oocitos incubados con SP600125, indicando que JNK podría tener un papel anti-apoptótico a tiempos cortos de activación (Fig. 20A). Sin embargo, la combinación SP600125 + BIRB796 inhibe parcialmente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 4 h después del shock hiperosmótico (Fig 21). Los resultados anteriores sugieren que la inhibición conjunta de las vías p38 y JNK reducen la liberación de citocromo c y la activación de caspasa-3, pero no bloquean completamente la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.

Para obtener más información sobre la función específica de p38 y JNK durante la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, hemos expresado los constitutivos activos de MKK6 (activa específicamente a p38), MEKK1 (activa JNK y p38) y MKK7 (activa específicamente a JNK), así como sus mutantes inactivos MKK6-DA, MEKK1-KM y MKK7-KM respectivamente. Los oocitos no tratados e inyectados con los diferentes mRNAs expresaron de forma eficiente las distintas quinasas, pero no mostraron ningún cambio significativo en la actividad caspasa-3 y la salida de citocromo c. Estos resultados indican que la activación de la vía de señalización de p38 o la de JNK, o bien la activación

simultánea de ambas vías no es suficiente para inducir la apoptosis en los oocitos de *Xenopus*. Por otro lado, la activación sostenida de p38 mediante la expresión del constitutivo activo de MKK6 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico, efecto que es bloqueado por SB203580 o por BIRB796, indicando que la activación sostenida de p38 α/β favorece la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3. Asimismo, la expresión de un constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Esta aceleración es parcialmente inhibida por SP600125 y con mayor claridad por SB203580 y BIRB796, indicando que ambas vías de señalización (JNK y p38) regulan la apoptosis inducida por shock osmótico en los oocitos de *Xenopus*, con un mayor efecto pro-apoptótico de p38 respecto a JNK.

Esto se confirmó al expresar MKK7, un activador específico de la vía de señalización de JNK. La activación de las JNK endógenas inducida por MKK7 incrementó la actividad caspasa-3, pero los valores alcanzados solo fueron estadísticamente significativos 2 h después del shock hiperosmótico y no se observó una salida significativa de citocromo c 1 h después del tratamiento (Fig. 34), como si ocurre con la expresión de MKK6-DD (Fig. 23).

La magnitud y la duración de la señal de activación de p38 y JNK podrían ser importantes para sus efectos biológicos. La activación de p38 y JNK durante un período prolongado podría modificar el tipo de sustratos fosforilados, que a su vez determinarían el tipo de respuesta específica. Es generalmente aceptado que la fosforilación transitoria temprana de p38 o JNK esta asociada a la supervivencia celular, mientras que la activación prolongada y sostenida esta asociada a la apoptosis (Brozovic et al., 2004; Mansouri et al., 2003; Murphy et al., 2006; Roulston et al., 1998; Tobiume et al., 2001; Ventura et al., 2006). En muchas líneas celulares, y bajo ciertos estímulos, la activación de p38 y JNK es transitoria, lo que indica la existencia de mecanismos de regulación negativa, incluyendo la activación de diferentes fosfatasas (Cuadrado and Nebreda, 2010; Cuenda et al., 2007; Krause et al., 2001). La actividad de las MAPKs puede ser regulada de forma negativa por las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs), cuya transcripción se incrementa por estímulos que activan a las MAPKs, limitando así el periodo de activación de las MAPKs (Bellou *et al.*, 2009; Owens *et al.*, 2007).

En los oocitos de *Xenopus* los efectos de la transcripción no son posibles y esto podría explicar por qué la activación de p38 es persistente (Fig. 14), en contraste con otros sistemas celulares (de Nadal and Posas, 2010; Ferreiro *et al.*, 2010). Se ha descrito que la expresión estable del constitutivo activo de MKK6 es suficiente para inducir la parada del

ciclo celular en G1 con la aparición de características morfológicas y bioquímicas de senescencia (Haq *et al.*, 2002). Se ha visto también que la expresión de MKK6 elimina la colonización metastásica en el cáncer de ovario humano (Hickson *et al.*, 2006). Del mismo modo, la sobreexpresión de MEKK1 induce apoptosis mediante la producción de ROS, pero sin liberación de citocromo c (Mendoza *et al.*, 2005). El mismo grupo ha descrito que la apoptosis inducida por MEKK1 es mediada por la liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria de manera independiente de la activación de JNK (Mendoza *et al.*, 2005). En nuestro modelo de oocitos de *Xenopus*, ya hemos dicho que la sobreexpresión de MEKK1 no induce apoptosis, sino que acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Los oocitos que expresaban el constitutivo activo de MEKK1 tampoco presentaron salida de Smac/DIABLO en ausencia del estrés osmótico (datos no mostrados).

Para saber cual de las isoformas de p38 se activa durante el shock hiperosmótico con sorbitol en los oocitos de *Xenopus*, hemos expresado todas las isoformas de p38 salvajes, así como sus dominantes negativos. La expresión de las isoformas salvajes de p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ y sus mutantes catalíticamente inactivos indican que el shock osmótico con sorbitol induce únicamente la activación de p38 α , p38 β y p38 γ en los oocitos de *Xenopus*, y que la expresión de estas isoformas o sus mutantes no alteran significativamente la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Los datos también sugieren que p38 β podría ser pro-apoptótico (Fig. 25). Se ha descrito que p38 α esta implicado en la inducción de apoptosis en varios tipos celulares y ante distintos tipos de estrés. Estos efectos pueden estar mediados por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, los cuales pueden afectar a los receptores de la muerte, a vías de supervivencia o bien a miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Coulthard *et al.*, 2009; Wagner and Nebreda, 2009). Se ha visto que p38 α juega un papel pro-apoptótico mediante la fosforilación de Bax y BimEL (Cai *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha descrito también que puede regular la supervivencia celular a través de la fosforilación de la caspasa-3 y la caspasa-8 (Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004). En los oocitos de *Xenopus* se ha descrito que la activación de p38 γ regula la transición G2/M durante la progresión meiótica (Perdiguero *et al.*, 2003).

Para estudiar con más detalle cual de las isoformas de p38 es o son responsables de la aceleración de la apoptosis inducida por el constitutivo activo de MKK6, ante el shock hiperosmótico, hemos expresado los constitutivos activos de p38 α , p38 β , p38 γ , y p38 δ . La expresión de los constitutivos activos de p38 α y p38 β en los oocitos no tratados aumenta significativamente los niveles de fosforilación de p38 (Fig. 29), mientras que no tienen

ningún efecto sobre la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3. Estos resultados indican que la activación de una de las isoformas de p38 no es suficiente para inducir la apoptosis en los oocitos de *Xenopus* tal como hemos comentado anteriormente para la expresión del constitutivo activo de MKK6. Sin embargo, la expresión del constitutivo activo de p38 β acelera la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico. Estos resultados sugieren que la isoforma β de p38 tiene un papel más pro-apoptótico que el resto de isoformas durante el estrés inducido por shock osmótico. Hasta la fecha no nos consta que se haya implicado a p38 β como una quinasa pro-apoptótica en algún tipo de estrés celular. De hecho, la bibliografía indica que p38 β tendría un papel anti-apoptótico en distintos tipos celulares y ante distintos estímulos (Ferrari *et al.*, 2012; Nemoto *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2011). Algunos de estos efectos anti-apoptóticos serían debidos a la regulación transcripcional mediada por p38 β (Kim *et al.*, 2005; Si and Liu, 2009).

La expresión combinada de MKK6-DD y p38 β , p38 γ o p38 δ salvajes inhibe la activación de caspasa-3 y la salida de citocromo c inducidas por el constitutivo activo de MKK6 en los oocitos tratados con sorbitol durante 1 h, mientras que la expresión de MKK6-DD y p38 α no varía esta aceleración (Fig. 28B, E, H). Es posible que la activación conjunta de p38 α , p38 β y p38 γ endógenas debida a MKK6-DD sea más efectiva que la activación de las isoformas exógenas. Datos no mostrados indican que la sobreexpresión de MKK6-DD junto con p38 α y p38 β salvajes también reducen la aceleración de la apoptosis mediada por el constitutivo activo de MKK6. No se ha probado que ocurre con la expresión de MKK6-DD junto con p38 α , p38 β y p38 γ salvajes. También es posible que la sobreexpresión de las isoformas de p38 con myc en la región N-terminal interfiera con la función de las isoformas de p38 endógenas. Es decir, las p38 sin myc serían más efectivas induciendo apoptosis que las p38 sobreexpresadas que contienen myc.

La expresión del constitutivo activo de MKK6 y p38 γ induce la maduración de los oocitos (Perdiguero *et al.*, 2003), que tienen niveles más bajos de actividad caspasa-3 y salida de citocromo c después del shock hiperosmótico con sorbitol (Fig. 28B). Este resultado está de acuerdo con los datos publicados por otros autores, que describen que los oocitos maduros desarrollan resistencia a la apoptosis (Johnson *et al.*, 2010).

Por otro lado, la expresión combinada del constitutivo activo de MKK6 con p38 δ salvaje incrementó solamente los niveles de fosforilación de p38 endógeno, pero no se observó fosforilación de p38 δ sobreexpresado, que tiene un peso molecular superior a las otras isoformas de p38 (Fig. 28G, H, I). Se ha descrito que p38 δ se activa por MKK3, pero no se activa por MKK6 (Remy *et al.*, 2010). Si el shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus*

induce la activación de MKK6 pero no activa a MKK3, esto podría explicar por qué p38 δ no se activa en este modelo celular.

La expresión de JNK1-1 (40 kDa) o JNK1-2 (49 kDa) en los oocitos de *Xenopus* indica que estas isoformas de JNK se fosforilan durante el shock hiperosmótico con sorbitol, y sugieren que contribuyen ligeramente a la apoptosis inducida por el shock osmótico, mientras que los mutantes sin actividad catalítica (AF y KR) no tienen ningún efecto. (Fig. 32). La expresión combinada del constitutivo activo de MKK7 junto con JNK1-1 o JNK1-2 incrementa los niveles de fosforilación de JNK1-1 y JNK1-2 respectivamente, pero no induce la apoptosis, lo que indica que la activación sostenida de las isoformas JNK1-1 o JNK1-2 no es suficiente para inducir la apoptosis en los oocitos de *Xenopus*. Sin embargo, la co-expresión del constitutivo activo de MKK7 junto con JNK1-1 o JNK1-2 durante el shock hiperosmótico, aumenta los niveles de activación de caspasa-3 y la salida de citocromo c (Fig. 34). Estos resultados indican que la activación sostenida de JNK1-1 y JNK1-2 acelera la apoptosis inducida por shock hiperosmótico. Curiosamente, se observó proteólisis de JNK1-2 después del shock osmótico cuando los niveles de actividad caspasa-3 son altos (Fig. 34). De hecho, hemos comprobado que la proteólisis de JNK1-2 es dependiente de caspasa-3 y contribuye a la salida masiva de citocromo c (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados obtenidos indican claramente que p38 β , JNK1-1 y JNK1-2 participan en la regulación de la apoptosis inducida por shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus*. La inhibición de p38 y JNK con SP600125 + BIRB796 reduce pero no bloquea completamente la apoptosis inducida por shock hiperosmótico. Teniendo en cuenta que varias quinasas pueden ser activadas por shock hiperosmótico (Soufi *et al.*, 2009), la inhibición de las vías de señalización de p38 y JNK representa solamente una parte de la red de quinasas activadas, y podría explicar el efecto parcial que tienen sobre la apoptosis de los oocitos. Alternativamente, deben existir otros mecanismos adicionales activados por el shock hiperosmótico, independientes de las proteínas quinasas, que podrían contribuir a la muerte celular. De hecho, hemos encontrado dos factores relevantes que regulan la apoptosis inducida por shock hiperosmótico: las calpaínas y Smac/DIABLO.

3. Las calpaínas regulan la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

En este trabajo se muestra que el shock hiperosmótico induce una activación rápida de calpaínas en los oocitos de *Xenopus*. La proteólisis de fodrina α , un sustrato de las calpaínas, se detecta por Western blot entre 5 -15 min después del tratamiento con sorbitol 300 mM. Además, la proteólisis de fodrina α inducida por el shock hiperosmótico se inhibe con la microinyección de EGTA (Fig. 37B) o bien con los inhibidores específicos de calpaínas ALLN y MDL28170 (Fig. 39B). La activación rápida de calpaínas puede explicarse por un aumento transitorio de Ca^{2+} . Se ha descrito que el shock hiperosmótico induce, en muchos tipos celulares, aumentos transitorios de Ca^{2+} en el citosol unos minutos después del estrés (Dascalu *et al.*, 1995; Denis and Cyert, 2002; Erickson *et al.*, 2001; Marchenko and Sage, 2000; Viladevall *et al.*, 2004). La liberación de Ca^{2+} es una de las respuestas primarias ante el shock hiperosmótico y podría tener un papel importante en la adaptación de la célula a las nuevas condiciones ambientales. Se ha descrito, por ejemplo, que la fodrina α proteólizada no tiene capacidad de interactuar con la actina (Harris and Morrow, 1990). Por lo tanto, la activación rápida de las calpaínas induce la proteólisis de fodrina α que puede provocar la reorganización del citoesqueleto de forma coordinada con la variación del volumen celular debido al transporte de la agua y de los iones para inducir cambios en la forma celular. Los niveles de fodrina α proteólizada se incrementan a partir de 3 - 4 h de shock hiperosmótico, en correlación con la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 (Fig. 35). Esto se puede explicar fácilmente, ya que la fodrina α también puede ser proteólizada por caspasa-3 generando fragmentos de 150 y 120 kDa (Ulbricht *et al.*, 2003; Vanags *et al.*, 1996). Además, también se ha descrito que la calpastatina (inhibidor natural de calpaínas) se proteóliza por la caspasa-3 (Kato *et al.*, 2000; Mikosik *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1998a), lo que provocaría un incremento de la actividad de las calpaínas después de la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3. Este "feedback loop" positivo, en combinación con otros, podría ser importante para la irreversibilidad de la muerte celular. El aumento de la proteólisis tardía de fodrina α inducida por la caspasa-3 podría dar lugar a una desorganización irreversible del citoesqueleto en los oocitos.

La inhibición de las calpaínas con ALLN y MDL28170 retrasa la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock osmótico (Fig. 39), mientras que la microinyección de EGTA retrasa la salida de citocromo c inducida por el estrés hiperosmótico (Fig.41), pero no altera significativamente los niveles de actividad caspasa-3

(Fig. 37A). Es posible que el EGTA inhiba la activación temprana de las calpaínas (dependiente de Ca^{2+}) pero no afecte a la activación tardía de las calpaínas (independiente de Ca^{2+}), mientras que los inhibidores ALLN y MDL28170 inhiben las calpaínas todo el tiempo, lo que explica el efecto diferencial de estos compuestos sobre la apoptosis. En cualquier caso, estos inhibidores no tienen efecto a tiempos largos de estrés osmótico (4 h), pues los oocitos presentan una elevada actividad caspasa-3 (Fig. 39).

Las calpaínas pueden regular la apoptosis a través de la proteólisis de diversos miembros de la familia Bcl-2; incluyendo Bax (Gao *et al.*, 2000; Toyota *et al.*, 2003), Bid (Gil-Parrado *et al.*, 2002; Mandic *et al.*, 2002), Bcl-2 y Bcl-x_L (Gil-Parrado *et al.*, 2002). La proteólisis de Bax por las calpaínas genera un fragmento de 18 kDa que induce la salida de citocromo c de forma independiente de Bcl-2 (Gao *et al.*, 2000; Toyota *et al.*, 2003). Las calpaínas también son capaces de activar otros sustratos que están involucrados en la regulación de la apoptosis tales como Apaf1 (Fettucciari *et al.*, 2006), JNK (Tan *et al.*, 2006), AIF (Delavallee *et al.*, 2011; Norberg *et al.*, 2010), e incluso proteólizar su propio inhibidor, la calpastatina (Porn-Ares *et al.*, 1998). En nuestro modelo de oocitos de *Xenopus*, la inhibición de las calpaínas (con EGTA o con inhibidores específicos) no afecta a la fosforilación de JNK y p38 (Fig. 41 y datos no mostrados).

El factor inductor de apoptosis (AIF) se libera de la mitocondria durante la apoptosis y puede mediar la muerte celular independiente de caspasas (Susin *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 1996). Una vez liberado puede translocarse al núcleo para provocar la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina nuclear (Delavallee *et al.*, 2011; Joza *et al.*, 2009). Hemos observado también que el shock hiperosmótico con sorbitol incrementa los niveles de AIF (67 y 62 kDa) en el citosol y la aparición de una forma de 57 kDa (tAIF) (Fig. 37), que se ha descrito es liberada al citosol cuando AIF (62 kDa) es proteólizada por calpaínas (Delavallee *et al.*, 2011; Norberg *et al.*, 2010). Curiosamente, se ha descrito en mitocondrias aisladas del cerebro que la liberación de AIF es independiente de la activación de calpaínas (Joshi *et al.*, 2009). En la apoptosis inducida en el cerebro por excitotoxicidad con NMDA, la forma no proteólizada de AIF (62 kDa) se libera de las mitocondrias por un mecanismo que implica los polímeros PAR generados por PARP-1 (Andrabi *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Las calpaínas no son necesarias para la liberación de la forma 62 kDa de AIF (Wang *et al.*, 2009), y se ha calculado que alrededor del 30% de AIF esta unida débilmente a la membrana mitocondrial externa en el lado citosólico (Yu *et al.*, 2009). Del mismo modo, el shock hiperosmótico en los oocitos podría inducir la liberación de AIF que se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa de

manera independiente de la presencia del calcio y la activación de calpaínas (Fig. 37). Los ensayos realizados con ratones Harlequín (Hq), genéticamente modificados para expresar un 80% menos de AIF, han sugerido que esta proteína actúa como un limpiador de radicales libres (Klein *et al.*, 2002). Por lo tanto, no podemos descartar que el aumento temprano de los niveles citosólicos de AIF sea un mecanismo de protección para evitar la apoptosis inducida por estrés osmótico. Son necesarios más estudios para determinar si el shock hiperosmótico induce la formación de ROS y clarificar la función de AIF en la apoptosis.

El aumento de la activación de las calpaínas se observa en numerosas patologías, incluyendo la lesión neuronal y la neurodegeneración, la formación de cataratas, la esclerosis múltiple y el infarto de miocardio (Storr *et al.*, 2011). La retinopatía diabética y las cataratas diabéticas son la causa principal de la pérdida de visión (Kyselova *et al.*, 2004), que están relacionadas con el aumento patológico de los niveles de Ca^{2+} que conduce a la activación intensa de las calpaínas (Azuma *et al.*, 2004; Paquet-Durand *et al.*, 2007; Sakamoto-Mizutani *et al.*, 2002). Los pericitos de la retina se pierden en la etapa temprana de la retinopatía diabética (Mizutani *et al.*, 1996) y se ha visto que la apoptosis inducida por el aumento de glucosa en los cultivos de pericitos retinianos se protege parcialmente con un inhibidor de las calpaínas (Miwa *et al.*, 2003). La activación de las calpaínas puede inducir también la proteólisis de los cristalinos solubles de la lente, lo que reduce la transparencia de la lente y da lugar a la formación de cataratas (Harris *et al.*, 2006). Los estudios que utilizan modelos de ratones *in vivo* indican que el estrés osmótico es un factor importante que contribuye a estas patologías (Chan *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que la activación de las calpaínas inducida por el shock hiperosmótico, junto con la activación de p38 β , JNK1-1 y JNK1-2, y la salida de Smac/DIABLO, podrían ser factores importantes para el desarrollo de estas enfermedades y podría ayudar a diseñar un tratamiento mejor.

4. Smac/DIABLO regula la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

Los resultados obtenidos muestran que el shock hiperosmótico induce la salida rápida de Smac/DIABLO mitocondrial 5 min después del tratamiento, mucho antes que ocurra la salida de citocromo c. Es más, el bloqueo de Smac/DIABLO inyectando un anticuerpo específico inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3, inducida por el shock hiperosmótico, mientras que no afecta a la actividad de las calpainas (Fig. 42). Estos resultados indican claramente que la salida temprana de Smac/DIABLO mitocondrial inducida por el shock hiperosmótico regula la salida tardía del citocromo c para promover la apoptosis.

En las células sometidas al estrés, la cinética de liberación de citocromo c y de Smac/DIABLO desde la mitocondria al citosol varía dependiendo del estímulo y del tipo celular considerado. Se ha descrito que hay una salida temprana del citocromo c antes de la liberación de Smac/DIABLO en respuesta a estaurosporina (Zhang *et al.*, 2004). Se ha visto una liberación simultánea de citocromo c y Smac/DIABLO ante diferentes estímulos en células MCF-7 (Rehm *et al.*, 2003) y durante la apoptosis inducida por la radiación ultravioleta (UV) en células Hela (Zhou *et al.*, 2005). Otros estudios han descrito que hay una liberación temprana de Smac/DIABLO en respuesta a cefalostatina (Rudy *et al.*, 2008). Por otro lado, no se ha determinado si la liberación de Smac/DIABLO durante la apoptosis es a través de la misma ruta que la utilizada por el citocromo c.

En presencia de estímulos apoptóticos Smac/DIABLO y el citocromo c se liberan desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol. Una vez en el citosol, Smac/DIABLO interactúa con los IAPs neutralizando su actividad inhibitoria, favoreciendo así la activación de las caspasas y promoviendo la apoptosis (Munoz-Pinedo *et al.*, 2006; Verhagen *et al.*, 2000; Wilkinson *et al.*, 2004). Por otro lado, el citocromo c interactúa con la molécula adaptadora Apaf-1 que se unirá a la procaspasa 9 formándose el apoptosoma (Hill *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 1999). Este, a su vez activa a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), para desencadenar las últimas fases de la apoptosis (Li *et al.*, 1997; Robertson and Orrenius, 2000). Aunque el mecanismo exacto de liberación de las proteínas apoptóticas mitocondriales sigue siendo incierto, parece ser que los miembros de la familia Bcl-2 juegan un papel importante en la regulación de los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Los estudios han mostrado que los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-x_L, y Mcl-1 preservan la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante la unión a los canales de las porinas

mitocondriales (Adams *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 1999). La apoptosis tiene lugar cuando las proteínas pro-apoptóticas con un solo dominio BH3 ('BH3-only') como Bid, Bim, y Noxa se unen a los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 y promueven la unión de las proteínas pro-apoptóticas multidominio Bax y Bak a la membrana externa de la mitocondria, donde inician los cambios de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (Bouillet and Strasser, 2002; Cheng *et al.*, 2001). Sin embargo, durante la salida temprana de Smac/DIABLO inducida por el shock hiperosmótico, la caspasa-3 no se activa (Fig. 35) y ocurren otros eventos adicionales (activación de calpaínas, p38 y JNK) que son necesarios para la salida tardía de citocromo c y la activación de caspasa-3. Estos datos sugieren que la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, que provoca la salida de Smac/DIABLO, no es suficiente para estimular la liberación de citocromo c, y que se necesitan otros eventos adicionales para promover la salida de citocromo c desde la mitocondria al citosol. Se ha descrito que la interrupción de la interacción entre el citocromo c y la cardiolipina es necesaria, antes o durante la permeabilización de la membrana externa para permitir la liberación de citocromo c desde las mitocondrias (Kagan *et al.*, 2009; Ott *et al.*, 2002). La modificación oxidativa de la cardiolipina podría ser importante para la movilización del citocromo c unido (Belikova *et al.*, 2007; Kagan *et al.*, 2005). Se ha visto también que la activación de caspasa-2 puede alterar la interacción de citocromo c con los fosfolípidos aniónicos, en particular la cardiolipina, facilitando la liberación de citocromo c (Enoksson *et al.*, 2004). En nuestro modelo de apoptosis inducido por el shock hiperosmótico no hemos estudiado el papel de los ROS, pero si hemos visto una activación tardía de la caspasa 2, en paralelo a la activación de la caspasa-3 (datos no mostrados).

¿ Cómo regula Smac/DIABLO la liberación de citocromo c ? Una posibilidad sería que Smac/DIABLO activara una caspasa desconocida a través de la inhibición de las IAPs. De hecho, el efecto del inhibidor general de caspasas Z-VAD.fmk retrasa la salida de citocromo c inducida por el shock hiperosmótico independientemente de la caspasa-3, ya que el inhibidor específico de caspasa-3 Z-DEVD.fmk no reduce la salida de citocromo c (Fig. 40). Esto sugiere que alguna caspasa, distinta a la caspasa-3, podría ser activada de forma temprana antes de la salida de citocromo c. Curiosamente, la microinyección del anticuerpo contra Smac/DIABLO inhibe significativamente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 medida por Western blot (Fig. 42), pero no bloquea completamente la actividad enzimática, medida como proteólisis del péptido Z-DEVD-AMC (datos no mostrados), lo que sugiere que otra caspasa podría ser activada

por una vía alternativa independiente del citocromo c. De hecho, las calpaínas no se inhiben mediante la microinyección del anticuerpo contra Smac/DIABLO (Fig. 42), y por lo tanto podrían contribuir a la activación de otra caspasa. Se ha descrito que las caspasas 7, 9, 10 y 12 son sustratos de calpaínas. Las caspasas 10 y 7 se activan por la proteólisis mediada por calpaínas, mientras que la caspasa-9 se inhibe (Chua et al., 2000; Gafni et al., 2009). Durante el estrés del retículo endoplasmático, las calpaínas pueden activar la caspasa-12, dando lugar a la apoptosis (Martinez et al., 2010; Tan et al., 2006). La caspasa-12 ha sido propuesta como una caspasa iniciadora y también como una molécula clave durante el estrés del retículo endoplasmático (Di et al., 2006; Rao et al., 2004). De hecho, la caspasa-12 se ha sugerido como un activador directo de la caspasa-9, independientemente de la liberación de citocromo c de la mitocondria y la formación del apoptosoma (Morishima et al., 2002; Rao et al., 2002). Del mismo modo, la cefalostatina 1, un compuesto natural aislado a partir de un gusano marino, induce la muerte celular en las células tumorales a través de un vía independiente de la apoptosoma pero dependiente de la caspasa-9, como respuesta al estrés del retículo endoplasmático que se acompaña por la activación de la caspasa-4, que actúa "upstream" de la caspasa -9, y sin liberación del citocromo c (Dirsch et al., 2003; Rudy et al., 2008). Se necesitan más estudios para determinar si el shock hiperosmótico induce también el estrés del retículo endoplasmático y la activación de la caspasa-12 y / o la caspasa-4 en los oocitos de *Xenopus*. Tampoco se puede descartar la activación de otras caspasas iniciadoras como la caspasa-8 o la caspasa-10.

Por ultimo, la salida de Smac/DIABLO se incrementa significativamente a tiempos tardíos (2 – 4 h), junto a la salida masiva de citocromo c y la activación de caspasa-3 (Fig. 35). La inhibición simultanea de calpaínas y caspasa-3 reduce la salida de Smac/DIABLO (Fig. 41), sugiriendo que la liberación de esta proteína también esta regulada por uno o varios "feedback loops" positivos.

5. Coreografía de la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que una de las primeras respuestas (5 min) de la célula al estrés hiperosmótico es la activación de las calpaínas y la salida de Smac/DIABLO al citosol, eventos que son independientes. El shock hiperosmótico induce también la activación rápida de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ) y JNK (JNK1-1 y JNK1-2), que se incrementa de forma progresiva alcanzando el máximo de actividad después de 1 h de tratamiento y permaneciendo elevada durante varias horas. Tiene sentido fisiológico que

una célula sometida a estrés evalúe cuidadosamente toda la información disponible, ya que la muerte celular es una decisión irreversible. Las proteínas quinasas de estrés JNK y p38 son unos sensores perfectos (con elevada ultrasensibilidad) para evaluar esta situación. Pueden generar, mediante fosforilación de algunos sustratos, una respuesta protectora. Sin embargo, después de una activación sostenida en el tiempo, pueden también iniciar un programa de apoptosis mediante fosforilación de un conjunto diferente de sustratos. Las mitocondrias pueden integrar la información recibida por Smac/DIABLO, las calpaínas y las proteínas quinasas de estrés para tomar una decisión. Es probable que la célula encuentre situaciones reversibles que le permita recuperarse cuando el estrés desaparece o disminuye su intensidad. La salida del citocromo c al citosol, alcanzando unos niveles elevados, sería un punto de no retorno, ya que se pueden activar múltiples "feedback loops" positivos. Por ejemplo, las calpaínas pueden inducir la salida del citocromo c y la activación de caspasa-3, que a su vez aumenta la activación de calpaínas (Kato *et al.*, 2000; Mikosik *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1998a). Las proteínas quinasas pueden activar la caspasa-3, que a su vez induce la activación constitutiva de las quinasas "upstream" mediante proteólisis (Enomoto *et al.*, 2003). O como hemos descrito en este trabajo, la activación sostenida de p38 acelera la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3, que a su vez puede activar la p38. Por último, la activación de caspasa-3 induce la proteólisis de JNK1-2, que a su vez favorece la salida de citocromo c y un mayor incremento de la actividad caspasa-3 (datos no mostrados).

En conclusión, la descripción temporal de los eventos importantes inducidos por el shock hiperosmótico que culminan en la apoptosis de los oocitos (coreografía de la apoptosis) sería la siguiente (Fig. 43):

5 min después del shock hiperosmótico se produce una activación de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ), JNK (JNK1-1 y JNK1-2) y las calpaínas. Al mismo tiempo, hay una salida parcial de Smac/DIABLO y AIF de la mitocondria lo que sugiere que la apertura de los poros mitocondriales podría ser muy rápida y transitoria. En esta primera etapa, no hay una salida significativa de citocromo c, ni activación de caspasa-3. 1 h después del shock hiperosmótico, las proteínas quinasas ultrasensibles p38 y JNK alcanzan la máxima actividad, que puede mantenerse durante varias horas. No se observa salida de citocromo c ni activación de caspasa-3 entre 1 y 2 h, lo que sugiere que el programa de apoptosis es todavía reversible y que la maquinaria celular está evaluando la intensidad y la duración del estrés, así como el daño sufrido. Es muy probable que todas estas respuestas iniciales tengan un papel protector para el oocito. Las calpaínas modificarían el citoesqueleto,

Smac/DIABLO y AIF podrían reducir la producción de ROS, y las proteínas quinasas de estrés podrían fosforilar algunos sustratos que regulan la supervivencia. Sin embargo, entre 2 y 4 h después del shock hiperosmótico hay un incremento significativo de la salida de Smac/DIABLO y citocromo c al citosol, probablemente por la formación de poros mitocondriales como consecuencia de la activación sostenida de p38/JNK y otras quinasas. La salida masiva de citocromo c y Smac/DIABLO inducirá ahora la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-3, que a su vez activará varios “feedback loops” positivos haciendo que el programa de muerte celular sea irreversible.

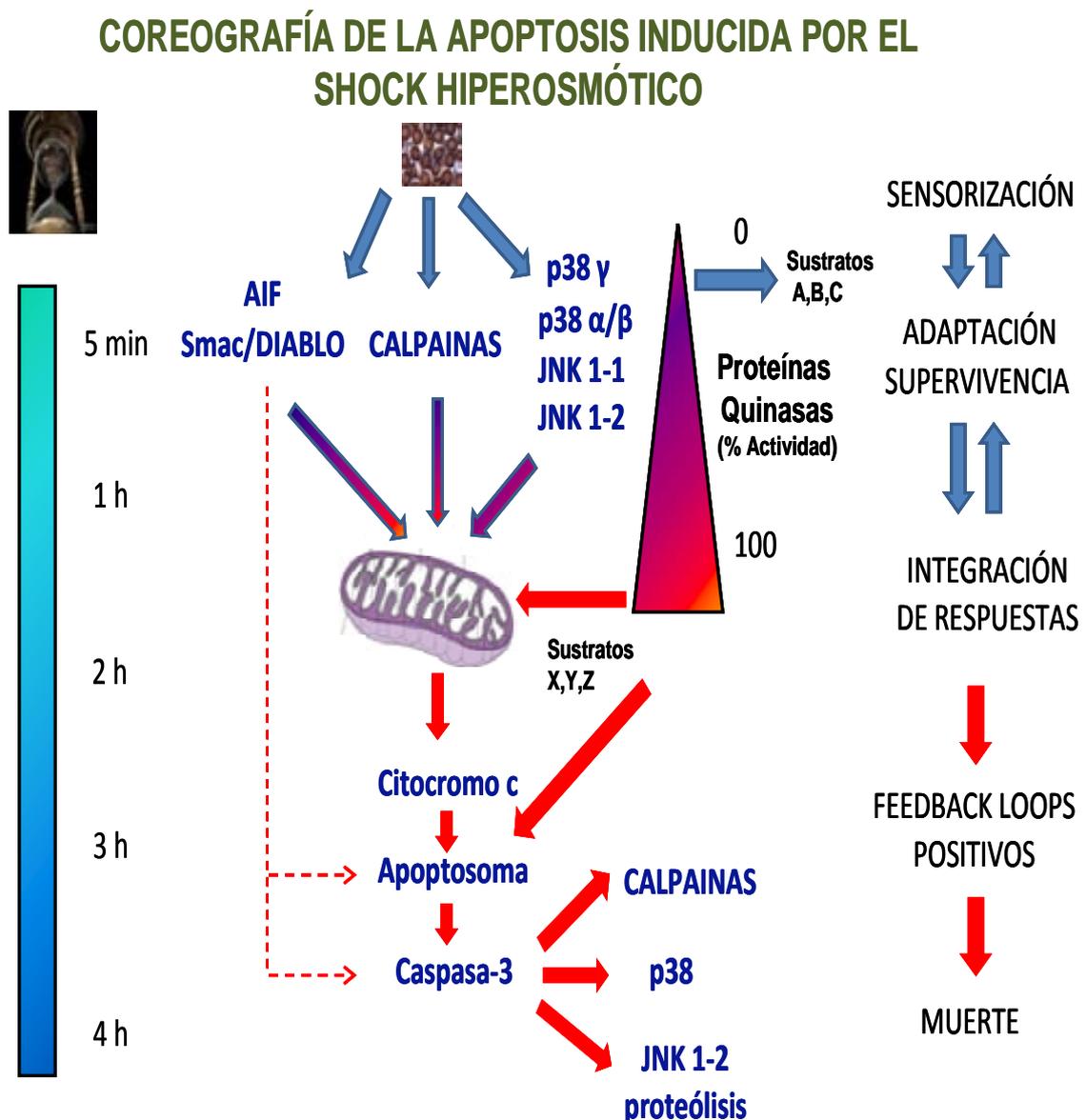


Figura. 43 Esquema representativo de la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico

VIII) CONCLUSIONES

- 1) El shock hiperosmótico induce la activación de p38 α , p38 β y p38 γ en los oocitos de *Xenopus*.
- 2) La respuesta de p38 al estrés hiperosmótico es ultrasensible y monoestable, y la activación a nivel de célula individual es bimodal con dos picos de distribución de una manera dependiente de tiempo.
- 3) La salida de citocromo c al citosol induce la activación de p38, mediada por la activación de caspasa-3.
- 4) Los compuestos SB203580 (inhibidor de p38 α/β), BIRB796 (inhibidor de p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) o SP600125 (inhibidor de JNK) no inhiben la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico en los oocitos de *Xenopus*.
- 5) La inhibición simultánea de la vía de p38 y JNK con la combinación de SP600125 + BIRB796 inhibe parcialmente la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock hiperosmótico, pero no bloquea completamente la apoptosis.
- 6) La expresión de un constitutivo activo de MKK6 acelera la apoptosis inducida por shock hiperosmótico, efecto que es inhibido por SB203580 o por BIRB796, indicando que la activación sostenida de p38 α/β favorece la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3.
- 7) La expresión de p38 β salvaje o de un constitutivo activo de p38 β acelera la activación de caspasa-3 y la salida de citocromo c, indicando que la isoforma β tiene un papel más pro-apoptótico que el resto de isoformas durante el estrés osmótico.
- 8) El shock hiperosmótico induce la activación de JNK1-1 y JNK1-2 en los oocitos de *Xenopus*.
- 9) La expresión de un constitutivo activo de MEKK1 acelera la apoptosis inducida por el shock osmótico, efecto que es parcialmente inhibido por SP600125 y con mayor claridad por SB203580 y BIRB796, indicando que ambas vías de señalización (JNK y p38) regulan la apoptosis de los oocitos.

- 10) La expresión de un constitutivo activo de MKK7 junto con las isoformas JNK1-1 y JNK1-2 incrementa la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.
- 11) El shock hiperosmótico induce la salida rápida de Smac/DIABLO mitocondrial y la activación de las calpaínas, antes de que se produzca la salida de citocromo c.
- 12) La inhibición de las calpaínas reduce la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3 inducida por el shock hiperosmótico.
- 13) El bloqueo de Smac/DIABLO inyectando un anticuerpo específico inhibe la salida de citocromo c y la activación de caspasa-3, indicando que la salida temprana de Smac/DIABLO mitocondrial regula la salida tardía de citocromo c y la activación de caspasa-3.
- 14) El inhibidor Z-VAD.fmk reduce la salida de citocromo c de manera independiente de caspasa-3, indicando que alguna otra caspasa podría ser activada por shock hiperosmótico antes de la salida de citocromo c.
- 15) En resumen, la activación sostenida de las proteínas quinasas de estrés p38 y JNK, junto a la salida rápida de Smac/DIABLO al citosol y la activación de las calpaínas son responsables de la apoptosis inducida por el shock hiperosmótico.

IX) BIBLIOGRAFÍA

1. Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.
2. Alonso G, Ambrosino C, Jones M, and Nebreda AR (2000) Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem*, **275**, 40641-40648.
3. Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, Ronnstrand L, Wernstedt C, and Andersson T (2004) p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J Exp Med*, **199**, 449-458.
4. Ambrosino C and Nebreda AR (2001) Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell*, **93**, 47-51.
5. Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, and Dawson TM (2006) Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18308-18313.
6. Aoshiba K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J, and Nagai A (1999) Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J Immunol*, **162**, 1692-1700.
7. Aquilano K, Filomeni G, Di RL, Vito M, Stefano C, Salimei PS, Ciriolo MR, and Marfe G (2007) Reactive oxygen and nitrogen species are involved in sorbitol-induced apoptosis of human erythroleukaemia cells K562. *Free Radic Res*, **41**, 452-460.
8. Arthur JS (2008) MSK activation and physiological roles. *Front Biosci*, **13**, 5866-5879.
9. Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, **2**, 420-430.
10. Ashkenazi A and Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.
11. Askari N, Beenstock J, Livnah O, and Engelberg D (2009) p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry*, **48**, 2497-2504.
12. Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, Vandenaabeele P, Vandenneede JR, Merlevede W, de WP, and Agostinis P (1999) The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem*, **274**, 8788-8796.
13. Avitzour M, Diskin R, Raboy B, Askari N, Engelberg D, and Livnah O (2007) Intrinsically active variants of all human p38 isoforms. *FEBS J*, **274**, 963-975.

14. Azuma M, Sakamoto-Mizutani K, Nakajima T, Kanaami-Daibo S, Tamada Y, and Shearer TR (2004) Involvement of calpain isoforms in retinal degeneration in WBN/Kob rats. *Comp Med*, **54**, 533-542.
15. Bae MA and Song BJ (2003) Critical role of c-Jun N-terminal protein kinase activation in troglitazone-induced apoptosis of human HepG2 hepatoma cells. *Mol Pharmacol*, **63**, 401-408.
16. Bagowski CP and Ferrell JE, Jr. (2001) Bistability in the JNK cascade. *Curr Biol*, **11**, 1176-1182.
17. Bagowski CP, Xiong W, and Ferrell JE, Jr. (2001) c-Jun N-terminal kinase activation in *Xenopus laevis* eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 1459-1465.
18. Bao ST, Gui SQ, and Lin MS (2006) Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **5**, 580-583.
19. Barbero S, Mielgo A, Torres V, Teitz T, Shields DJ, Mikolon D, Bogyo M, Barila D, Lahti JM, Schlaepfer D, and Stupack DG (2009) Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res*, **69**, 3755-3763.
20. Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, Witasz E, Kurnikov IV, Tyurina YY, Tyurin VA, Amoscato AA, Jiang J, Kochanek PM, DeKosky ST, Greenberger JS, Shvedova AA, and Kagan VE (2006) Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 648-659.
21. Beckerle MC, Burridge K, DeMartino GN, and Croall DE (1987) Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell*, **51**, 569-577.
22. Belikova NA, Jiang J, Tyurina YY, Zhao Q, Epperly MW, Greenberger J, and Kagan VE (2007) Cardiolipin-specific peroxidase reactions of cytochrome C in mitochondria during irradiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **69**, 176-186.
23. Bellou S, Hink MA, Bagli E, Panopoulou E, Bastiaens PI, Murphy C, and Fotsis T (2009) VEGF autoregulates its proliferative and migratory ERK1/2 and p38 cascades by enhancing the expression of DUSP1 and DUSP5 phosphatases in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297**, C1477-C1489.
24. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD, and Kimchi A (2010) Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci*, **35**, 556-564.
25. Blanchard H, Grochulski P, Li Y, Arthur JS, Davies PL, Elce JS, and Cygler M (1997) Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat Struct Biol*, **4**, 532-538.

26. Boatright KM and Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 725-731.
27. Bode AM and Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*, **46**, 591-598.
28. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, and Wallach D (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, **270**, 7795-7798.
29. Bortner CD and Cidlowski JA (1996) Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol*, **271**, C950-C961.
30. Bouillet P and Strasser A (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci*, **115**, 1567-1574.
31. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, and Davis RJ (2003) Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*, **17**, 1969-1978.
32. Braun C, Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seitz G, Zang KD, and Welter C (1999) Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int J Cancer*, **84**, 6-9.
33. Braun T, Dar S, Vorobiov D, Lindenboim L, Dascal N, and Stein R (2003) Expression of Bcl-x(S) in *Xenopus* oocytes induces BH3-dependent and caspase-dependent cytochrome c release and apoptosis. *Mol Cancer Res*, **1**, 186-194.
34. Brewster JL, de VT, Dwyer ND, Winter E, and Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
35. Brocker C, Thompson DC, and Vasiliou V (2012) The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts*, **3**, 345-364.
36. Brozovic A, Fritz G, Christmann M, Zisowsky J, Jaehde U, Osmak M, and Kaina B (2004) Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer*, **112**, 974-985.
37. Brun G, Vannier P, Scovassi I, and Callen JC (1981) DNA topoisomerase I from mitochondria of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem*, **118**, 407-415.
38. Burg MB, Ferraris JD, and Dmitrieva NI (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*, **87**, 1441-1474.
39. Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A, and Xia Z (2006) p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*, **281**, 25215-25222.

40. Cai J and Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*, **273**, 11401-11404.
41. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, and Santucci R (2009) Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Curr Med Chem*, **16**, 4058-4065.
42. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, and Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-862.
43. Chan AW, Ho YS, Chung SK, and Chung SS (2008) Synergistic effect of osmotic and oxidative stress in slow-developing cataract formation. *Exp Eye Res*, **87**, 454-461.
44. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, and Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 705-711.
45. Cheng J, Zhu Y, He S, Lu Y, Chen J, Han B, Petrillo M, Wrzeszczynski KO, Yang S, Dai P, Zhai S, Han D, Zhang MQ, Li W, Liu X, Li H, Chen ZY, and Yuan H (2011) Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *Am J Hum Genet*, **89**, 56-66.
46. Chiong M, Parra V, Eisner V, Ibarra C, Maldonado C, Criollo A, Bravo R, Quiroga C, Contreras A, Vicencio JM, Cea P, Bucarey JL, Molgo J, Jaimovich E, Hidalgo C, Kroemer G, and Lavandero S (2010) Parallel activation of Ca(2+)-induced survival and death pathways in cardiomyocytes by sorbitol-induced hyperosmotic stress. *Apoptosis*, **15**, 887-903.
47. Chua BT, Guo K, and Li P (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*, **275**, 5131-5135.
48. Clotet J and Posas F (2007) Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol*, **428**, 63-76.
49. Coll O, Morales A, Fernandez-Checa JC, and Garcia-Ruiz C (2007) Neutral sphingomyelinase-induced ceramide triggers germinal vesicle breakdown and oxidant-dependent apoptosis in *Xenopus laevis* oocytes. *J Lipid Res*, **48**, 1924-1935.
50. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, Ingravallo G, Modica S, Lo SG, Moschetta A, Guanti G, and Simone C (2007) A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ*, **14**, 693-702.
51. Cory S and Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2**, 647-656.
52. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, and Burchill SA (2009) p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med*, **15**, 369-379.

53. Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, and Kroemer G (2007) Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis*, **12**, 3-18.
54. Cuadrado A and Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, **429**, 403-417.
55. Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, and Goedert M (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J*, **16**, 295-305.
56. Cuenda A and Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1358-1375.
57. Cuevas BD, Abell AN, and Johnson GL (2007) Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, **26**, 3159-3171.
58. Curtin JF and Cotter TG (2003) Apoptosis: Historical perspectives. *Essays Biochem*, **39**, 1-10.
59. Czogalla A and Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1913-1924.
60. Danial NN and Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.
61. Dascalu A, Oron Y, Nevo Z, and Korenstein R (1995) Hyperosmotic modulation of the cytosolic calcium concentration in a rat osteoblast-like cell line. *J Physiol*, **486** (Pt 1), 97-104.
62. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
63. de NE and Posas F (2010) Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J*, **29**, 4-13.
64. Debatin KM and Krammer PH (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, **23**, 2950-2966.
65. Delavallee L, Cabon L, Galan-Malo P, Lorenzo HK, and Susin SA (2011) AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life*, **63**, 221-232.
66. Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, and Wu X (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*, **115**, 61-70.
67. Denis V and Cyert MS (2002) Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*, **156**, 29-34.

68. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, and Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
69. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, and Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.
70. Deveraux QL and Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-252.
71. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, and Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**, 300-304.
72. Dhanasekaran DN and Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, **27**, 6245-6251.
73. Di SF, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, and Cecconi F (2006) Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem*, **281**, 2693-2700.
74. Dirsch VM, Muller IM, Eichhorst ST, Pettit GR, Kamano Y, Inoue M, Xu JP, Ichihara Y, Wanner G, and Vollmar AM (2003) Cephalostatin 1 selectively triggers the release of Smac/DIABLO and subsequent apoptosis that is characterized by an increased density of the mitochondrial matrix. *Cancer Res*, **63**, 8869-8876.
75. Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
76. Du PD, Dupre A, and Jesus C (2011) Unfertilized *Xenopus* eggs die by Bad-dependent apoptosis under the control of Cdk1 and JNK. *PLoS One*, **6**, e23672.
77. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, **35**, 495-516.
78. Elsner HA, Honck HH, Willmann F, Kreienkamp HJ, and Iglauer F (2000) Poor quality of oocytes from *Xenopus laevis* used in laboratory experiments: prevention by use of antiseptic surgical technique and antibiotic supplementation. *Comp Med*, **50**, 206-211.
79. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, and Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
80. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, and Keating MT (2005) p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev*, **19**, 1175-1187.
81. Enoksson M, Robertson JD, Gogvadze V, Bu P, Kropotov A, Zhivotovsky B, and Orrenius S (2004) Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and

- disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem*, **279**, 49575-49578.
82. Enomoto A, Suzuki N, Morita A, Ito M, Liu CQ, Matsumoto Y, Yoshioka K, Shiba T, and Hosoi Y (2003) Caspase-mediated cleavage of JNK during stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 837-842.
 83. Enslen H, Raingeaud J, and Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*, **273**, 1741-1748.
 84. Erickson GR, Alexopoulos LG, and Guilak F (2001) Hyper-osmotic stress induces volume change and calcium transients in chondrocytes by transmembrane, phospholipid, and G-protein pathways. *J Biomech*, **34**, 1527-1535.
 85. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, and Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 929-935.
 86. Fan TJ, Han LH, Cong RS, and Liang J (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **37**, 719-727.
 87. Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, Zhang X, Valacca C, Poggio P, Pintucci G, and Mignatti P (2012) TGF-beta1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38beta to proapoptotic p38alpha. *Mol Cancer Res*, **10**, 605-614.
 88. Ferreiro I, Joaquin M, Islam A, Gomez-Lopez G, Barragan M, Lombardia L, Dominguez O, Pisano DG, Lopez-Bigas N, Nebreda AR, and Posas F (2010) Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. *BMC Genomics*, **11**, 144.
 89. Fettucciari K, Fettriconi I, Mannucci R, Nicoletti I, Bartoli A, Coaccioli S, and Marconi P (2006) Group B Streptococcus induces macrophage apoptosis by calpain activation. *J Immunol*, **176**, 7542-7556.
 90. Friis MB, Friborg CR, Schneider L, Nielsen MB, Lambert IH, Christensen ST, and Hoffmann EK (2005) Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J Physiol*, **567**, 427-443.
 91. Fuentes-Prior P and Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, **384**, 201-232.
 92. Gafni J, Cong X, Chen SF, Gibson BW, and Ellerby LM (2009) Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J Biol Chem*, **284**, 25441-25449.
 93. Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, Diaz-Araya G, and Lavandero S (2001) A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res*, **304**, 279-285.

94. Gao G and Dou QP (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem*, **80**, 53-72.
95. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, and Jiang X (2007) A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem*, **282**, 30718-30727.
96. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, and Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, **13**, 1423-1433.
97. Gatidis S, Zelenak C, Fajol A, Lang E, Jilani K, Michael D, Qadri SM, and Lang F (2011) p38 MAPK activation and function following osmotic shock of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, **28**, 1279-1286.
98. Germain M and Shore GC (2003) Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE*, **2003**, e10.
99. Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, Halayko AJ, Kadkhoda K, Krocak TJ, Gibson SB, Booy EP, Naderi-Manesh H, and Los M (2008) Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J Cell Mol Med*, **12**, 1005-1022.
100. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, and Los M (2009) Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*, **46**, 497-510.
101. Ghavami S, Kerkhoff C, Los M, Hashemi M, Sorg C, and Karami-Tehrani F (2004) Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J Leukoc Biol*, **76**, 169-175.
102. Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, Knoch TA, Auerswald EA, Welsh K, Reed JC, Fritz H, Fuentes-Prior P, Spiess E, Salvesen GS, and Machleidt W (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem*, **277**, 27217-27226.
103. Goss GG, Jiang L, Vandorpe DH, Kieller D, Chernova MN, Robertson M, and Alper SL (2001) Role of JNK in hypertonic activation of Cl(-)-dependent Na(+)/H(+) exchange in Xenopus oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C1978-C1990.
104. Green DR and Martin SJ (1995) The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol*, **7**, 694-703.
105. Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-1911.
106. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, and Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*, **15**, 2760-2770.

107. Gupta S, Campbell D, Derijard B, and Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.
108. Han J, Lee JD, Bibbs L, and Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.
109. Hanna RA, Campbell RL, and Davies PL (2008) Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, **456**, 409-412.
110. Hanna RA, Garcia-Diaz BE, and Davies PL (2007) Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS Lett*, **581**, 2894-2898.
111. Haq R, Brenton JD, Takahashi M, Finan D, Finkielstein A, Damaraju S, Rottapel R, and Zanke B (2002) Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res*, **62**, 5076-5082.
112. Harris AS and Morrow JS (1990) Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3009-3013.
113. Harris F, Biswas S, Singh J, Dennison S, and Phoenix DA (2006) Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, **1084**, 452-480.
114. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
115. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, and Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7**, 2135-2148.
116. Hickson JA, Huo D, Vander Griend DJ, Lin A, Rinker-Schaeffer CW, and Yamada SD (2006) The p38 kinases MKK4 and MKK6 suppress metastatic colonization in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, **66**, 2264-2270.
117. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, and Martin SJ (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*, **23**, 2134-2145.
118. Hirai S, Katoh M, Terada M, Kyriakis JM, Zon LI, Rana A, Avruch J, and Ohno S (1997) MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 15167-15173.
119. Holtfreter B, Bandt C, Kuhn SO, Grunwald U, Lehmann C, Schutt C, and Grundling M (2006) Serum osmolality and outcome in intensive care unit patients. *Acta Anaesthesiol Scand*, **50**, 970-977.
120. Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, and Kracht M (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, **19**, 6742-6753.

121. Howell M and Hill CS (1997) XSmad2 directly activates the activin-inducible, dorsal mesoderm gene XFKH1 in *Xenopus* embryos. *EMBO J*, **16**, 7411-7421.
122. Huang P, Jiang Z, Teng S, Wong YC, Frohman MA, Chung SK, and Chung SS (2006) Synergism between phospholipase D2 and sorbitol accumulation in diabetic cataract formation through modulation of Na,K-ATPase activity and osmotic stress. *Exp Eye Res*, **83**, 939-948.
123. Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, and Wagner EF (2007) p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet*, **39**, 741-749.
124. Hunter AM, LaCasse EC, and Korneluk RG (2007) The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, **12**, 1543-1568.
125. Huot J, Houle F, Marceau F, and Landry J (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, **80**, 383-392.
126. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Ten DP, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, and Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-94.
127. Imajoh S, Kawasaki H, and Suzuki K (1986) The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem*, **99**, 1281-1284.
128. Imajoh S, Kawasaki H, and Suzuki K (1987) The COOH-terminal E-F hand structure of calcium-activated neutral protease (CANP) is important for the association of subunits and resulting proteolytic activity. *J Biochem*, **101**, 447-452.
129. Inoue H, Nojima H, and Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
130. Jacobson MD, Weil M, and Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-354.
131. Johnson CE, Freel CD, and Kornbluth S (2010) Features of programmed cell death in intact *Xenopus* oocytes and early embryos revealed by near-infrared fluorescence and real-time monitoring. *Cell Death Differ*, **17**, 170-179.
132. Joshi A, Bondada V, and Geddes JW (2009) Mitochondrial micro-calpain is not involved in the processing of apoptosis-inducing factor. *Exp Neurol*, **218**, 221-227.
133. Joza N, Pospisilik JA, Hangen E, Hanada T, Modjtahedi N, Penninger JM, and Kroemer G (2009) AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci*, **1171**, 2-11.
134. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida

- H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, and Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, **410**, 549-554.
135. Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Stoyanovsky DA, Wipf P, Kochanek PM, Greenberger JS, Pitt B, Shvedova AA, and Borisenko G (2009) Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*, **46**, 1439-1453.
136. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, and Borisenko GG (2005) Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, **1**, 223-232.
137. Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, and Molkentin JD (2004) Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 15524-15530.
138. Kang SJ, Wang S, Kuida K, and Yuan J (2002) Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ*, **9**, 1115-1125.
139. Kato M, Nonaka T, Maki M, Kikuchi H, and Imajoh-Ohmi S (2000) Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem*, **127**, 297-305.
140. Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Krause H, Magheli A, Schrader M, Schostak M, Miller K, and Weikert S (2008) Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value. *J Cancer Res Clin Oncol*, **134**, 543-550.
141. Kempkensteffen C, Jager T, Bub J, Weikert S, Hinz S, Christoph F, Krause H, Schostak M, Miller K, and Schrader M (2007) The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours. *Int J Androl*, **30**, 476-483.
142. Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
143. Keshet Y and Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*, **661**, 3-38.
144. Kim BJ, Ryu SW, and Song BJ (2006) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*, **281**, 21256-21265.
145. Kim HP, Wang X, Zhang J, Suh GY, Benjamin IJ, Ryter SW, and Choi AM (2005) Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide:

- involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1. *J Immunol*, **175**, 2622-2629.
146. Kim R (2005) Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, **103**, 1551-1560.
 147. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, and Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, **14**, 5579-5588.
 148. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, and Ackerman SL (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, **419**, 367-374.
 149. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, and Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.
 150. Krause D, Lyons A, Fennelly C, and O'Connor R (2001) Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. *J Biol Chem*, **276**, 19244-19252.
 151. Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, and Zhivotovsky B (2012) Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 1787-1797.
 152. Kultz D and Burg M (1998) Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol*, **201**, 3015-3021.
 153. Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Marquez R, and Cuenda A (2005) BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **280**, 19472-19479.
 154. Kyriakis JM and Avruch J (1996) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays*, **18**, 567-577.
 155. Kyriakis JM and Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807-869.
 156. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, and Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.
 157. Kyselova Z, Stefek M, and Bauer V (2004) Pharmacological prevention of diabetic cataract. *J Diabetes Complications*, **18**, 129-140.
 158. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, and MacKenzie AE (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, **17**, 3247-3259.

159. Lancellotti M, Pereira RF, Cury GG, and Hollanda LM (2009) Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. *Braz J Infect Dis*, **13**, 226-231.
160. Landshamer S, Hoehn M, Barth N, Duvezin-Caubet S, Schwake G, Tobaben S, Kazhdan I, Becattini B, Zahler S, Vollmar A, Pellecchia M, Reichert A, Plesnila N, Wagner E, and Culmsee C (2008) Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ*, **15**, 1553-1563.
161. Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, and Wieder T (2004) Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, **11**, 231-243.
162. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, and Wesselborg S (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*, **14**, 277-287.
163. Lazarou M, Stojanovski D, Frazier AE, Kotevski A, Dewson G, Craigen WJ, Kluck RM, Vaux DL, and Ryan MT (2010) Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J Biol Chem*, **285**, 36876-36883.
164. Ledgerwood EC and Morison IM (2009) Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, **15**, 420-424.
165. Lee YJ, Lee DH, Cho CK, Chung HY, Bae S, Jhon GJ, Soh JW, Jeoung DI, Lee SJ, and Lee YS (2005) HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKCdelta-mediated ROS production. *Oncogene*, **24**, 3715-3725.
166. Letai A (2006) Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell*, **21**, 728-730.
167. Li J and Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **27**, 6194-6206.
168. Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, and Williams RS (2000) Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, **101**, 389-399.
169. Li LY, Luo X, and Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
170. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, and Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
171. Li W, Srinivasula SM, Chai J, Li P, Wu JW, Zhang Z, Alnemri ES, and Shi Y (2002) Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol*, **9**, 436-441.
172. Liu L, Xing D, and Chen WR (2009) Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int J Cancer*, **125**, 2757-2766.

173. Liu X, Zou H, Slaughter C, and Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**, 175-184.
174. Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.
175. Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, and Kroemer G (2001) Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*, **15**, 758-767.
176. Lopatniuk P and Witkowski JM (2011) Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochim Pol*, **58**, 287-296.
177. López JM (2010) Digital kinases: A cell model for sensing, integrating and making choices. *Commun Integr Biol*, **3**, 146-150.
178. Lorenzi M (2007) The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*, **2007**, 61038.
179. Luo L, Li DQ, and Pflugfelder SC (2007) Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. *Cornea*, **26**, 452-460.
180. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, and Los M (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*, **10**, 13-29.
181. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, and Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
182. Mahalingam M and Cooper JA (2001) Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. *Prog Mol Subcell Biol*, **27**, 132-142.
183. Mamoune A, Luo JH, Lauffenburger DA, and Wells A (2003) Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res*, **63**, 4632-4640.
184. Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, and Shoshan MC (2002) Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **22**, 3003-3013.
185. Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, Siddik ZH, Mills GB, and Claret FX (2003) Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, **278**, 19245-19256.
186. Marchenko SM and Sage SO (2000) Effects of shear stress on [Ca²⁺]_i and membrane potential of vascular endothelium of intact rat blood vessels. *Exp Physiol*, **85**, 43-48.

187. Martiñeñez T, Frances S, and Lopez JM (2009) Generation of digital responses in stress sensors. *J Biol Chem*, **284**, 23902-23911.
188. Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, and Lerner SF (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis*, **15**, 1480-1493.
189. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP, and Melendez-Zajgla J (2008) Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*, **27**, 48.
190. Martinou JC and Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, **21**, 92-101.
191. Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, and Alzari PM (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol*, **9**, 442-446.
192. Matthews CC and Feldman EL (1996) Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death. *J Cell Physiol*, **166**, 323-331.
193. McGrew LL, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB, and Richter JD (1989) Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev*, **3**, 803-815.
194. McKay MM and Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, **26**, 3113-3121.
195. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, and Peter ME (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, **16**, 2794-2804.
196. Mendoza FJ, Henson ES, and Gibson SB (2005) MEKK1-induced apoptosis is mediated by Smac/Diablo release from the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 1089-1098.
197. Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, and Burg MB (2000) Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, **278**, F209-F218.
198. Mikosik A, Zaremba A, Puchalska Z, Daca A, Smolenska Z, Lopatniuk P, Mital A, Hellman A, Bryl E, and Witkowski JM (2007) Ex vivo measurement of calpain activation in human peripheral blood lymphocytes by detection of immunoreactive products of calpastatin degradation. *Folia Histochem Cytobiol*, **45**, 343-347.
199. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson GL, and Karin M (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723.
200. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, and Susin SA (2001) NADH oxidase

- activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, **276**, 16391-16398.
201. Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr., and Ashwell JD (2005) Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*, **4**, 1189-1192.
 202. Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Kasuya Y, Yasuda Y, Kamiya H, and Hotta N (2003) The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Res Clin Pract*, **60**, 1-9.
 203. Mizutani M, Kern TS, and Lorenzi M (1996) Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest*, **97**, 2883-2890.
 204. Moldoveanu T, Gehring K, and Green DR (2008) Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, **456**, 404-408.
 205. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, and Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*, **277**, 34287-34294.
 206. Morizane Y, Honda R, Fukami K, and Yasuda H (2005) X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem*, **137**, 125-132.
 207. Morrison DK and Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 91-118.
 208. Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, Menissier-de MJ, and Susin SA (2007) Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol*, **27**, 4844-4862.
 209. Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, and Green DR (2006) Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11573-11578.
 210. Murphy LO and Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*, **31**, 268-275.
 211. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, and Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, **403**, 98-103.
 212. Nebreda AR and Porras A (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, **25**, 257-260.

213. Nemoto S, Xiang J, Huang S, and Lin A (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **273**, 16415-16420.
214. Newmeyer DD, Farschon DM, and Reed JC (1994) Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, **79**, 353-364.
215. Norberg E, Orrenius S, and Zhivotovsky B (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun*, **396**, 95-100.
216. Norbury CJ and Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 367-401.
217. Nutt LK, Margolis SS, Jensen M, Herman CE, Dunphy WG, Rathmell JC, and Kornbluth S (2005) Metabolic regulation of oocyte cell death through the CaMKII-mediated phosphorylation of caspase-2. *Cell*, **123**, 89-103.
218. Ola MS, Nawaz M, and Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, **351**, 41-58.
219. Olsson M and Zhivotovsky B (2011) Caspases and cancer. *Cell Death Differ*, **18**, 1441-1449.
220. Ono K and Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, **12**, 1-13.
221. Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, and Mihara K (2005) Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*, **24**, 1375-1386.
222. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, and Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1259-1263.
223. Ow YP, Green DR, Hao Z, and Mak TW (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 532-542.
224. Owens DM and Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, **26**, 3203-3213.
225. Paquet-Durand F, Johnson L, and Ekstrom P (2007) Calpain activity in retinal degeneration. *J Neurosci Res*, **85**, 693-702.
226. Pearce AK and Humphrey TC (2001) Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol*, **11**, 426-433.
227. Perdiguero E and Nebreda AR (2004) Use of *Xenopus* oocytes and early embryos to study MAPK signaling. *Methods Mol Biol*, **250**, 299-314.

228. Perdiguero E, Pillaire MJ, Bodart JF, Hennersdorf F, Frodin M, Duesbery NS, Alonso G, and Nebreda AR (2003) Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes and activates Cdc25C. *EMBO J*, **22**, 5746-5756.
229. Perez OD and Nolan GP (2002) Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. *Nat Biotechnol*, **20**, 155-162.
230. Petros AM, Olejniczak ET, and Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 83-94.
231. Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, and Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*, **280**, 6447-6454.
232. Porn-Ares MI, Samali A, and Orrenius S (1998) Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ*, **5**, 1028-1033.
233. Porras A, and Marzo I (2010) Apoptosis: una forma controlada de muerte celular. *SEBBM Divulgación*.
234. Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C, Benito M, and Nebreda AR (2004) P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell*, **15**, 922-933.
235. Qin S, Yang C, Li S, Xu C, Zhao Y, and Ren H (2012) Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment. *Cancer Lett*, **318**, 9-13.
236. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, and Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, **270**, 7420-7426.
237. Rana A, Gallo K, Godowski P, Hirai S, Ohno S, Zon L, Kyriakis JM, and Avruch J (1996) The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J Biol Chem*, **271**, 19025-19028.
238. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del RG, Bredesen DE, and Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem*, **277**, 21836-21842.
239. Rao RV, Ellerby HM, and Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*, **11**, 372-380.
240. Rathmell JC and Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, **109 Suppl**, S97-107.
241. Rehm M, Dussmann H, and Prehn JH (2003) Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J Cell Biol*, **162**, 1031-1043.
242. Reinehr R, Becker S, Braun J, Eberle A, Grether-Beck S, and Haussinger D (2006) Endosomal acidification and activation of NADPH oxidase isoforms are upstream

- events in hyperosmolarity-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, **281**, 23150-23166.
243. Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, and Haussinger D (2002) Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology*, **36**, 602-614.
244. Reinehr R and Haussinger D (2006) Hyperosmotic activation of the CD95 death receptor system. *Acta Physiol (Oxf)*, **187**, 199-203.
245. Remy G, Risco AM, Inesta-Vaquera FA, Gonzalez-Teran B, Sabio G, Davis RJ, and Cuenda A (2010) Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell Signal*, **22**, 660-667.
246. Rincon M and Davis RJ (2009) Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev*, **228**, 212-224.
247. Robertson JD and Orrenius S (2000) Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*, **30**, 609-627.
248. Roulston A, Reinhard C, Amiri P, and Williams LT (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, **273**, 10232-10239.
249. Roy SS, Ehrlich AM, Craigen WJ, and Hajnoczky G (2009) VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep*, **10**, 1341-1347.
250. Rozman-Pungercar J, Kopitar-Jerala N, Bogyo M, Turk D, Vasiljeva O, Stefe I, Vandenabeele P, Bromme D, Puizdar V, Fonovic M, Trstenjak-Prebanda M, Dolenc I, Turk V, and Turk B (2003) Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ*, **10**, 881-888.
251. Rudy A, Lopez-Anton N, Barth N, Pettit GR, Dirsch VM, Schulze-Osthoff K, Rehm M, Prehn JH, Vogler M, Fulda S, and Vollmar AM (2008) Role of Smac in cephalostatin-induced cell death. *Cell Death Differ*, **15**, 1930-1940.
252. Rupinder SK, Gurpreet AK, and Manjeet S (2007) Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*, **46**, 383-393.
253. Saelens X, Festjens N, Vande WL, van GM, van LG, and Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861-2874.
254. Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, and Kawashima S (1993) Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J Biol Chem*, **268**, 25239-25243.
255. Sakamoto-Mizutani K, Fukiage C, Tamada Y, Azuma M, and Shearer TR (2002) Contribution of ubiquitous calpains to cataractogenesis in the spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Exp Eye Res*, **75**, 611-617.

256. Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, and Ley SC (1996) Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncogene, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J*, **15**, 817-826.
257. Salvesen GS and Abrams JM (2004) Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, **23**, 2774-2784.
258. Salvesen GS and Riedl SJ (2008) Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, **615**, 13-23.
259. Sato K, Hattori S, Irie S, Sorimachi H, Inomata M, and Kawashima S (2004) Degradation of fodrin by m-calpain in fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *J Biochem*, **136**, 777-785.
260. Schad E, Farkas A, Jekely G, Tompa P, and Friedrich P (2002) A novel human small subunit of calpains. *Biochem J*, **362**, 383-388.
261. Schimmer AD (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, **64**, 7183-7190.
262. Schindler EM, Hinds A, Gribben EL, Burns CJ, Yin Y, Lin MH, Owen RJ, Longmore GD, Kissling GE, Arthur JS, and Efimova T (2009) p38delta Mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. *Cancer Res*, **69**, 4648-4655.
262. Schutze S, Tchikov V, and Schneider-Brachert W (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 655-662.
263. Scorrano L and Korsmeyer SJ (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 437-444.
264. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, and Korsmeyer SJ (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, **300**, 135-139.
265. Seifert A and Clarke PR (2009) p38alpha- and DYRK1A-dependent phosphorylation of caspase-9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress. *Cell Signal*, **21**, 1626-1633.
266. Seki E, Brenner DA, and Karin M (2012) A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*, **143**, 307-320.
267. Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukai I, and Fujii Y (2004) Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep*, **11**, 797-802.
268. Shaul YD and Seger R (2007) The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1213-1226.

269. Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, **9**, 459-470.
270. Shi Y and Gaestel M (2002) In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem*, **383**, 1519-1536.
271. Shimizu S, Narita M, and Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.
272. Shin JH, Jeong JY, Jin Y, Kim ID, and Lee JK (2011) p38beta MAPK affords cytoprotection against oxidative stress-induced astrocyte apoptosis via induction of alphaB-crystallin and its anti-apoptotic function. *Neurosci Lett*, **501**, 132-137.
273. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, and Shi Y (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, **11**, 519-527.
274. Si H and Liu D (2009) Isoflavone genistein protects human vascular endothelial cells against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis through the p38beta mitogen-activated protein kinase. *Apoptosis*, **14**, 66-76.
275. Silva G, Cunha A, Gregoire IP, Seldon MP, and Soares MP (2006) The antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 in endothelial cells involves the degradation of p38 alpha MAPK isoform. *J Immunol*, **177**, 1894-1903.
276. Sive LH, Grainger LM, Harland RM (2000) Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Coldspring Harbour Laboratory Press. pp 128-129.
277. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, and Garrido C (2000) Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*, **14**, 1833-1849.
278. Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, and Arthur JS (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J*, **22**, 2788-2797.
279. Sorimachi H, Hata S, and Ono Y (2010) Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp Anim*, **59**, 549-566.
280. Soufi B, Kelstrup CD, Stoehr G, Frohlich F, Walther TC, and Olsen JV (2009) Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics. *Mol Biosyst*, **5**, 1337-1346.
281. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, and Alnemri ES (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, **410**, 112-116.
282. Stegh AH and Peter ME (2001) Apoptosis and caspases. *Cardiol Clin*, **19**, 13-29.

283. Steller H (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, **267**, 1445-1449.
284. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, and Calderwood SK (1994) X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*, **54**, 12-15.
285. Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, and Martin SG (2011) The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*, **11**, 364-374.
286. 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, and Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
287. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, and Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, **184**, 1331-1341.
288. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, and Takahashi R (2001a) X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*, **276**, 27058-27063.
289. Suzuki Y, Nakabayashi Y, and Takahashi R (2001b) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8662-8667.
290. Szegezdi E, FitzGerald U, and Samali A (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 186-194.
291. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De VT, Elce JS, and Greer PA (2006) Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **281**, 16016-16024.
292. Thomas D, Hammerling BC, Wimmer AB, Wu K, Ficker E, Kuryshev YA, Scherer D, Kiehn J, Katus HA, Schoels W, and Karle CA (2004) Direct block of hERG potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (GF109203X). *Cardiovasc Res*, **64**, 467-476.
293. Thomas D, Wendt-Nordahl G, Rockl K, Ficker E, Brown AM, and Kiehn J (2001) High-affinity blockade of human ether-a-go-go-related gene human cardiac potassium channels by the novel antiarrhythmic drug BRL-32872. *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 753-761.
294. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
295. Thornton TM and Rincon M (2009) Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*, **5**, 44-51.

296. Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N, and Culmsee C (2011) Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ*, **18**, 282-292.
297. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, and Ichijo H (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
298. Tourian L, Jr., Zhao H, and Srikant CB (2004) p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. *J Cell Sci*, **117**, 6459-6471.
299. Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Moriyama M, Sudo T, and Mizuguchi J (2003) Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett*, **189**, 221-230.
300. Tran TH, Andreka P, Rodrigues CO, Webster KA, and Bishopric NH (2007) Jun kinase delays caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *J Biol Chem*, **282**, 20340-20350.
301. Twiddy D, Brown DG, Adrain C, Jukes R, Martin SJ, Cohen GM, MacFarlane M, and Cain K (2004) Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J Biol Chem*, **279**, 19665-19682.
302. Ulbricht KU, Schmidt RE, and Witte T (2003) Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev*, **2**, 109-113.
303. van LG, Saelens X, van GM, MacFarlane M, Martin SJ, and Vandenabeele P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*, **9**, 1031-1042.
304. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, and Orrenius S (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*, **271**, 31075-31085.
305. Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, and Davis RJ (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*, **21**, 701-710.
306. Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, Pasparakis M, and Nebreda AR (2007) p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet*, **39**, 750-758.
307. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, and Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
308. Verhagen AM and Vaux DL (2002) Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*, **7**, 163-166.

309. Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barcelo A, and Arino J (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 43614-43624.
310. Vivo C, Liu W, and Broaddus VC (2003) c-Jun N-terminal kinase contributes to apoptotic synergy induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand plus DNA damage in chemoresistant, p53 inactive mesothelioma cells. *J Biol Chem*, **278**, 25461-25467.
311. Wagner EF and Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, **9**, 537-549.
312. Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference?, by Kevin K.W. Wang Vol. 23, pp. 20-26. *Trends Neurosci*, **23**, 59.
313. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, and Allen H (1998a) Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, **356**, 187-196.
314. Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.
315. Wang X, Desfrant A, and Tournier C (2007) Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1349-1357.
316. Wang X, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS, Fearn C, Wang Y, Huang S, and Han J (2000) Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*, **20**, 4543-4552.
317. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J, and Chien KR (1998b) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*, **273**, 2161-2168.
318. Wang Y, Kim NS, Li X, Greer PA, Koehler RC, Dawson VL, and Dawson TM (2009) Calpain activation is not required for AIF translocation in PARP-1-dependent cell death (parthanatos). *J Neurochem*, **110**, 687-696.
319. Wang ZB, Liu YQ, and Cui YF (2005) Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int*, **29**, 489-496.
320. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
321. Wendt A, Thompson VF, and Goll DE (2004) Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol Chem*, **385**, 465-472.
322. Westfall PJ, Patterson JC, Chen RE, and Thorner J (2008) Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12212-12217.

323. Weston CR and Davis RJ (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 142-149.
324. Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, and Duckett CS (2004) Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem*, **279**, 51082-51090.
325. Wolf BB and Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*, **274**, 20049-20052.
326. Wu SG, Jeng FR, Wei SY, Su CZ, Chung TC, Chang WJ, and Chang HW (1998) Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients. *Nephron*, **78**, 28-32.
327. Wu YT, Tan HL, Huang Q, Kim YS, Pan N, Ong WY, Liu ZG, Ong CN, and Shen HM (2008) Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy*, **4**, 457-466.
328. Wyllie AH, Kerr JF, and Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.
329. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, and Matsumoto K (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, **270**, 2008-2011.
330. Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, and Nishida E (2002) JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep*, **3**, 69-75.
331. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, and Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
332. Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, and Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, **9**, 680-684.
333. Yethon JA, Epand RF, Leber B, Epand RM, and Andrews DW (2003) Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 48935-48941.
334. Yoshino T, Kishi H, Nagata T, Tsukada K, Saito S, and Muraguchi A (2001) Differential involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes. *Eur J Immunol*, **31**, 2702-2708.
335. Youle RJ and Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 47-59.

336. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, and Lin A (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell*, **13**, 329-340.
337. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, and Dawson VL (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18314-18319.
338. Yu SW, Wang Y, Frydenlund DS, Ottersen OP, Dawson VL, and Dawson TM (2009) Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro*, **1**.
339. Zhang H, Shi X, Zhang QJ, Hampong M, Paddon H, Wahyuningsih D, and Pelech S (2002) Nocodazole-induced p53-dependent c-Jun N-terminal kinase activation reduces apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells. *J Biol Chem*, **277**, 43648-43658.
340. Zhang XD, Gillespie SK, and Hersey P (2004) Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther*, **3**, 187-197.
341. Zhang Y, Xing D, and Liu L (2009a) PUMA promotes Bax translocation by both directly interacting with Bax and by competitive binding to Bcl-X L during UV-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*, **20**, 3077-3087.
342. Zhang YY, Mei ZQ, Wu JW, and Wang ZX (2008) Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. *J Biol Chem*, **283**, 26591-26601.
343. Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Hayes RL, and Wang KK (2009b) Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis*, **14**, 1289-1298.
344. Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, and Doskeland SO (1998) Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, **391**, 449-450.
345. Zhou LL, Zhou LY, Luo KQ, and Chang DC (2005) Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis. *Apoptosis*, **10**, 289-299.
346. Zou H, Li Y, Liu X, and Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-11556.
347. Zuluaga S, Alvarez-Barrientos A, Gutierrez-Uzquiza A, Benito M, Nebreda AR, and Porras A (2007) Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal*, **19**, 62-74.

