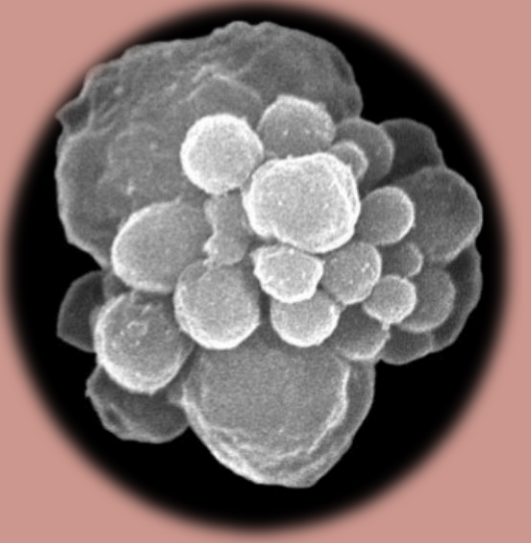




Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la muerte celular y patologías asociadas a alteraciones en dicha regulación

Trabajo Fin de Grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Irene Alameda García. Carlos Camacho Macorra.



1 Objetivos

- Entender los mecanismos implicados en la regulación de la apoptosis con el fin de mostrar su magnitud y su relevancia en el mantenimiento de la homeostasis de la célula.
- Reunir las evidencias que demuestran la participación de la apoptosis en distintas patologías, incidiendo especialmente en la proteína Mcl-1 como protagonista.

2 Introducción y antecedentes

Según la definición del Comité de Nomenclatura Sobre Muerte Celular, NCCD, (*Nomenclature Committee on Cell Death*) una célula se considera muerta cuando se dan uno o varios de los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

- la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática,
- la célula, incluyendo su núcleo, ha sufrido fragmentación completa, mostrando los denominados cuerpos apoptóticos y/o,
- los fragmentos de la célula han sido fagocitados por las células adyacentes.

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que participa en el desarrollo y la homeostasis de los organismos que forman parte del reino animal. Se caracteriza por la contracción de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la formación de burbujas en la membrana y finalmente la separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos, debido a la actividad proteolítica de las caspasas.

Caspasas

- Son cisteín-aspartato-proteasas
- Dos categorías:
 - Caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y 10) → Sustratos limitados: caspasas ejecutoras, BID y ellas mismas
 - Caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6 y -9) → Cientos de sustratos
- Formadas por:
 - Un prodominio que contiene motivos reguladores en las caspasas iniciadoras (DED y CARD)
 - Dos subunidades donde reside su actividad catalítica

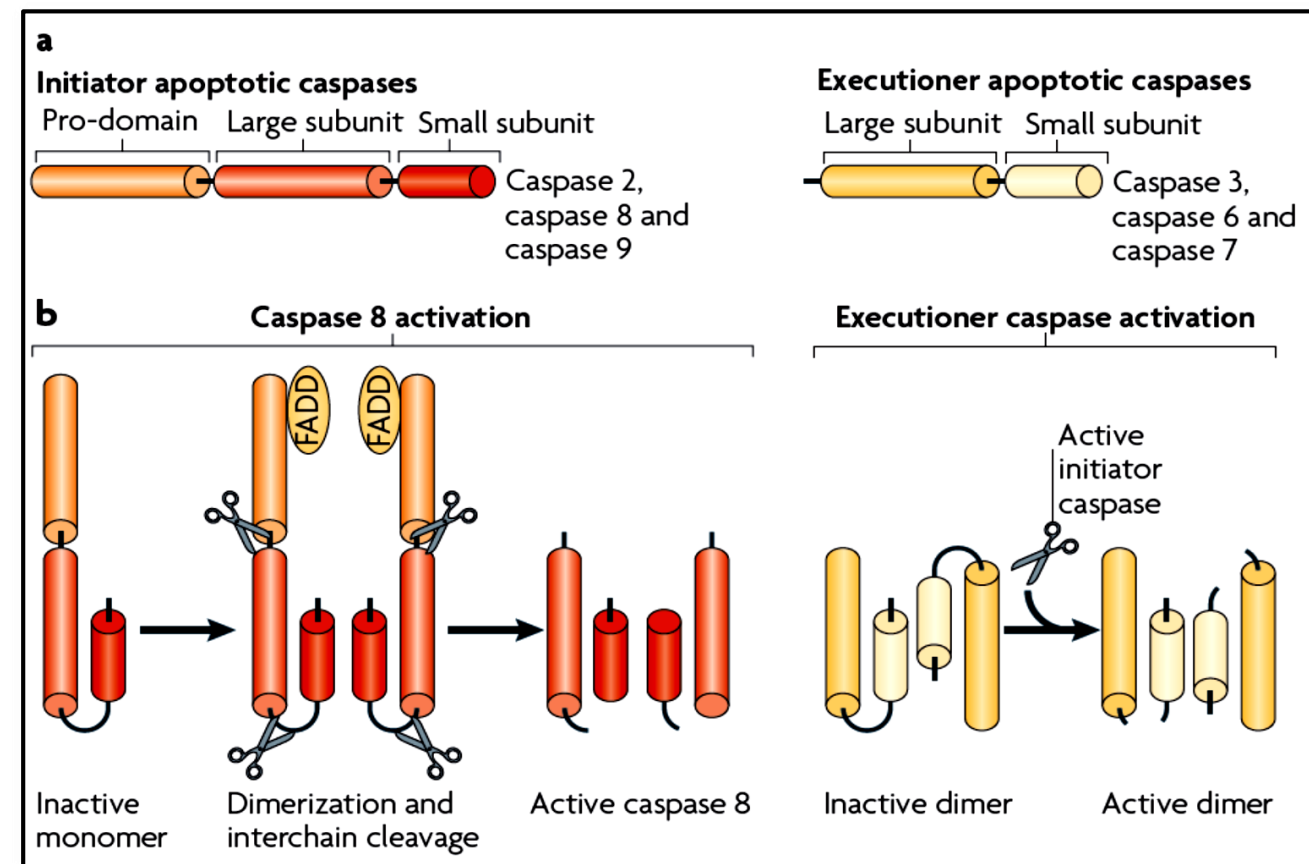


Figura 1. Estructura y activación de las caspasas. Las caspasas iniciadoras circulan inactivas en forma de monómeros y para su activación es

necesaria su dimerización. Los dímeros se forman debido a su reclutamiento a través de la unión de sus prodominios al adaptador FADD. Finalmente, se produce la escisión entre dominios para la estabilización de la caspasa activada. En contraste, las caspasas ejecutoras circulan inactivas en forma de dímeros y tan solo es necesaria la escisión por parte de una caspasa iniciadora para su activación.

Proteínas de la familia de Bcl-2

- Dos categorías:
 - Proteínas antiapoptóticas → Ejercen su función por acción directa sobre las proteínas proapoptóticas
 - Proteínas proapoptóticas → Efectoras y con un dominio BH3
- Formadas por:
 - 1-4 dominios de homología con la proteína Bcl-2 que condicionan su actividad → BH1, BH2, BH3 y BH4.

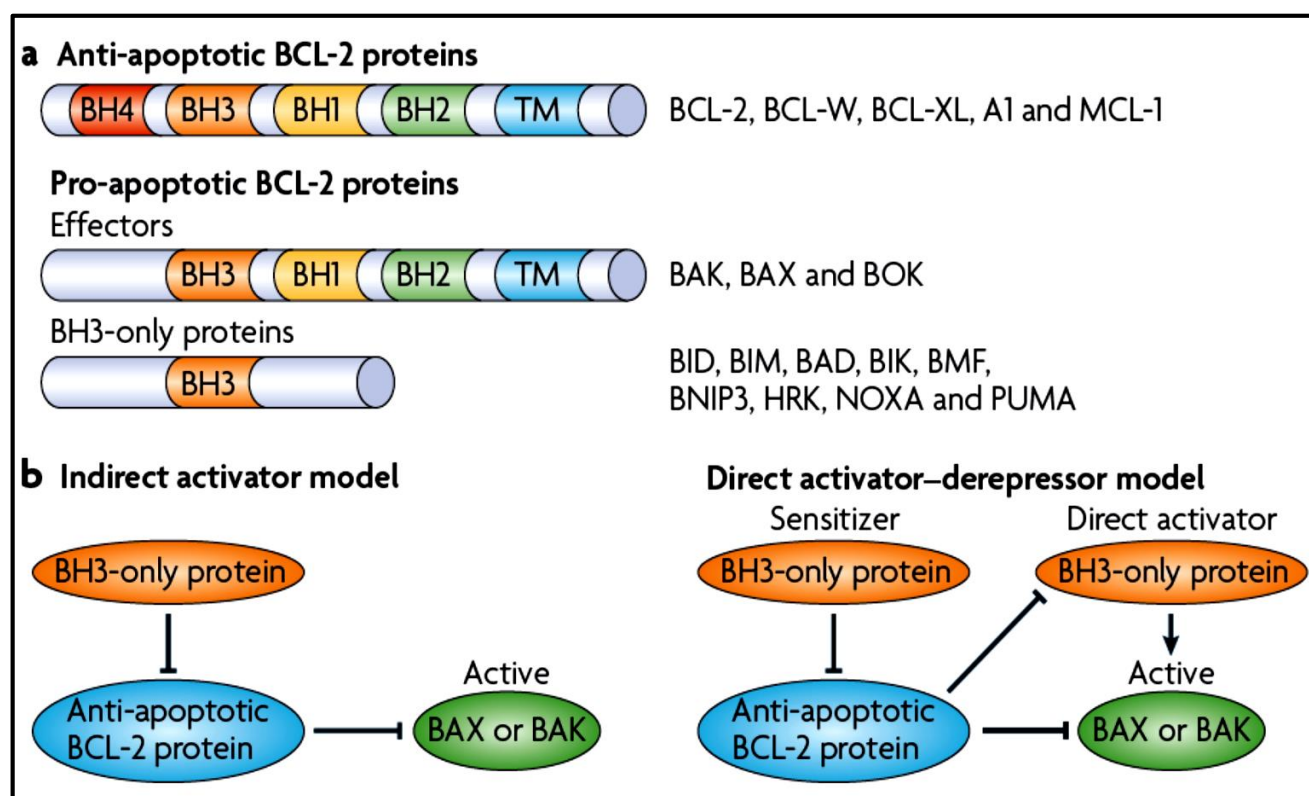


Figura 2. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas de la familia de Bcl-2. La activación de

las proteínas proapoptóticas Bax y Bak va a depender de su interacción con proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, proteínas proapoptóticas con un dominio BH3 o entre las propias Bax y Bak, existiendo distintos modelos para explicar su mecanismo de acción: directo, indirecto y mixto.

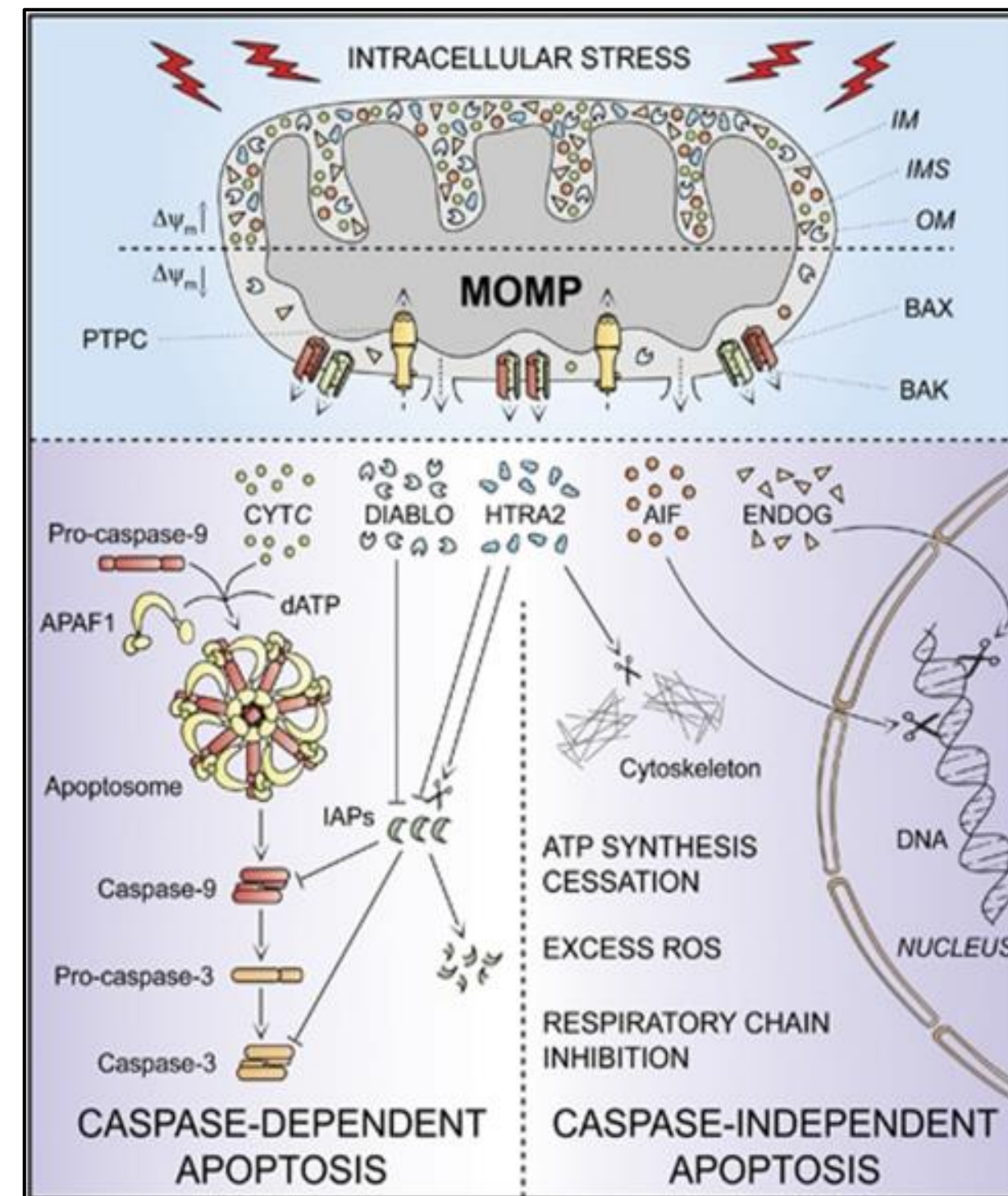


Figura 3. Apoptosis: Vía intrínseca caspasa dependiente y caspasa independiente. Está desencadenada por condiciones que dan lugar a estrés intracelular, provocando la acumulación de señales proapoptóticas en la superficie de la mitocondria. Se produce entonces la polimerización de Bak/Bax formando un poro que causa su permeabilización (MOMP). A continuación, se liberan proteínas del espacio intermembrana al citosol, como el CYTC, DIABLO, HTRA2, AIF y ENDOG.

- CYTC + APAF1 + dATP = Apoptosoma → activación caspasa-9 → activación caspasa-3 → caspasa proteolítica
- AIF y ENDOG → Núcleo → Fragmentación ADN
- SMAC/DIABLO y HTRA2 → Inhibición de IAP
- HTRA2 (serín proteasa) → Proteólisis

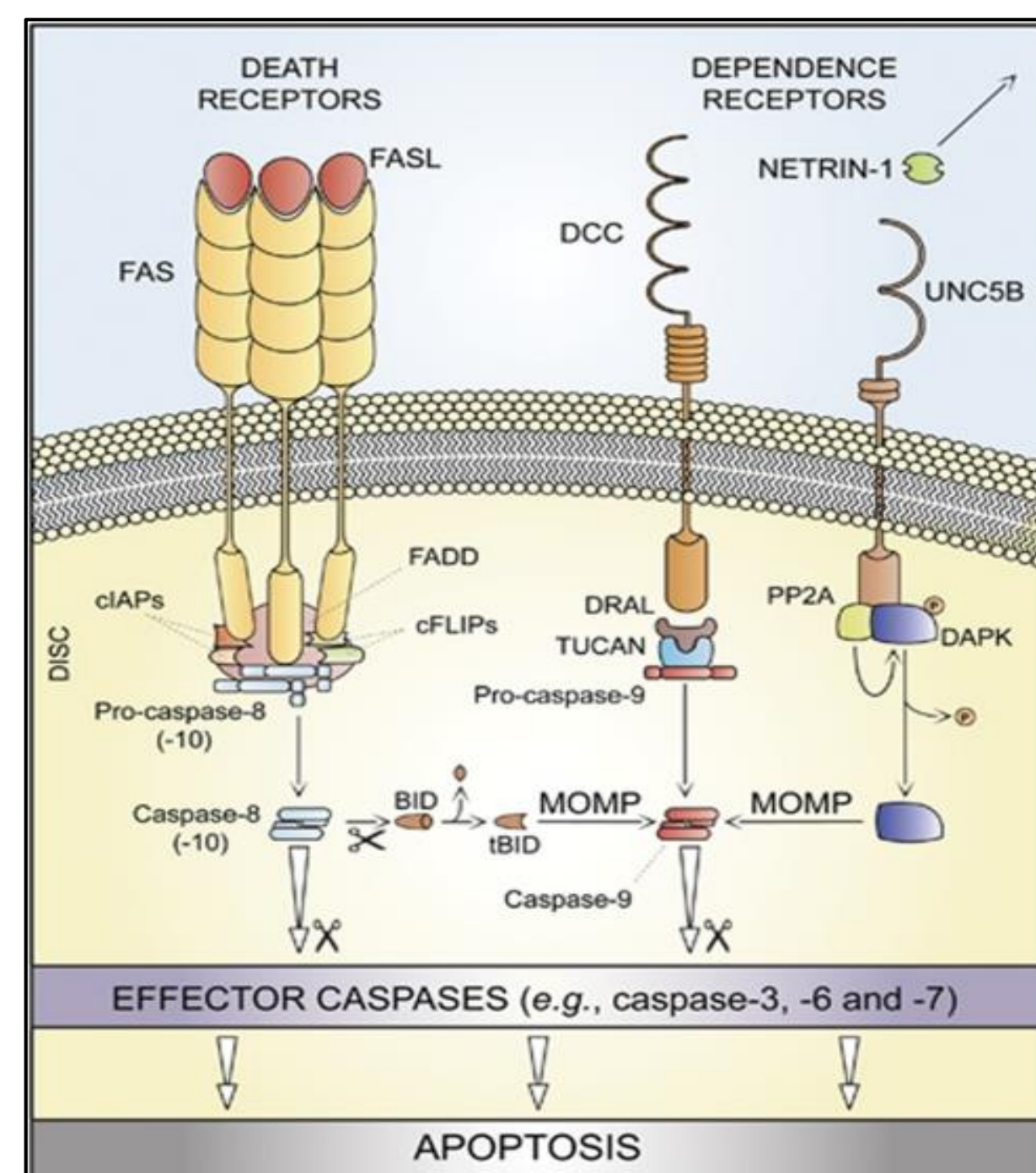


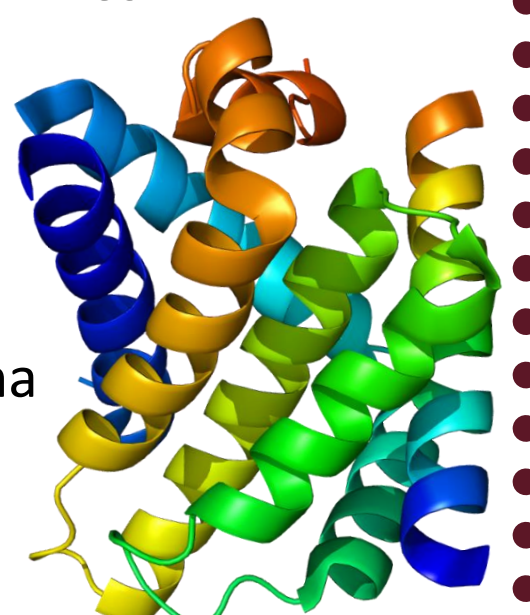
Figura 4. Apoptosis: Vía extrínseca. La ruta de señalización prototipo es la protagonizada por el ligando de Fas (FAS L). En su ausencia, las subunidades del receptor FAS se ensamblan espontáneamente dando lugar a trímeros que se estabilizan después con la unión de FAS L. Dicha unión induce cambios conformacionales que permiten el ensamblaje de un complejo multiprotéico (DISC) en su parte citosólica a través del dominio de muerte (DD). El complejo formado constituye la plataforma que regula la activación de las caspasas-8 y -10.

- Caspasas iniciadoras → Proteólisis BID → tBID → activación BAX/BAK → MOMP

3 Resultados y discusión

Mcl-1

- Myeloid cell leukaemia-1* es una proteína antiapoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2.
- Localización:** principalmente en la membrana externa mitocondrial
- Actividad:** promueve la supervivencia celular mediante la inhibición de la liberación del CYTC desde el interior de la mitocondria, a través de la heterodimerización y consecuente neutralización de Bak.
- Regulación:**
 - Transcripcional** → es inducida por factores de crecimiento y citoquinas a través de vías de señalización dependientes de MAPK, PI3K, JAK y STAT.
 - Post-transcripcional** → se ha observado la presencia de isoformas originadas por procesos de corte y empalme alternativo: Mcl-1L y Mcl-1S (Mcl-1L es antiapoptótica y Mcl-1S es proapoptótica).
 - Postraduccional** → cuenta con múltiples sitios de fosforilación que condicionan su estabilidad.



- Degradación:** se da principalmente vía proteosoma tras su ubiquitinación por parte de la proteína MULE.

Mcl-1: patologías en las que está implicada

Por exceso	Por defecto
Linfomas	Muerte embrionaria
Mieloma Múltiple	Alteración del mantenimiento y desarrollo de los linfocitos B y T
Leucemias crónicas y agudas	Apoptosis de neutrófilos
Cáncer (colon, pulmón, ovario, próstata, páncreas, riñón, SNC, melanoma, cabeza y cuello, mama, carcinoma hepatocelular, y adenocarcinoma pancreático)	Enfermedad de Crohn
	Sepsis severa
	Disminución de macrófagos

- Se ha descubierto que Mcl-1 promueve el mantenimiento de la morfología de la mitocondria y su producción energética.
- Dependiendo de la localización de Mcl-1 en la mitocondria, esta desempeñará una función u otra.
- El balance Mcl-1L / Mcl-1S condiciona el correcto funcionamiento de la fusión-fisión mitocondrial.

Mcl-1 como diana terapéutica

Los mecanismos que anulan la función antiapoptótica de Mcl-1 pueden ser divididos en dos categorías:

- aquellos que disminuyen los niveles de Mcl-1 mediante la inhibición de su expresión y/o inducción de su degradación
- aquellos que detienen la actividad antiapoptótica de Mcl-1 interrumpiendo la interacción Mcl-1-Bak.

- Fármacos que disminuyen los niveles de Mcl-1**
 - Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas
 - Flavopiridol
 - Sorafenib
- Inhibidores de la deubiquitinasa**
 - WP1130
- Tratamiento con oligonucleótidos antisentido (ASO)**
- BH3-miméticos**
 - Obatoclax
 - Gossypol
 - Sabutoclax (BI-97C1)

4 Conclusiones

- La muerte celular por apoptosis ha demostrado ser una estrategia esencial para proteger el equilibrio homeostático de los seres vivos.
- La alteración en la regulación de la apoptosis está presente en la etiopatogenia de muy diversas enfermedades. El nexo de unión entre las distintas enfermedades relacionadas con la apoptosis es el desequilibrio entre la supervivencia de las células y su destrucción.
- Se ha demostrado que Mcl-1 es una proteína cuya contribución a la regulación de la supervivencia de la célula está rápida y minuciosamente controlada a través de cambios en su transcripción, localización, estabilidad y habilidad para formar dímeros con homólogos de la familia de Bcl-2 y otras proteínas. Por ello, supone una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades en las que se encuentra implicada.