

Aspectos moleculares de la apoptosis y su inhibición en células infectadas con *Rickettsia rickettsii*

Molecular aspects of apoptosis and its inhibition in cells infected with *Rickettsia rickettsii*

Ana Patricia Fernández-Sánchez ⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio Clínico, Clínica Dr. Marcial Fallas, CCSS

Artículo recibido el 14/06/2018

Aceptado para su publicación el 07/07/2018

Correspondencia: anapat2089@hotmail.com

Resumen

Las células son capaces de reconocer el daño generado en sus organelas y si este resulta irreparable, inician el proceso de muerte celular programada llamado apoptosis. Una regulación aberrante de la apoptosis puede llevar a una acumulación celular patológica o a una pérdida inapropiada de células, lo que conlleva a enfermedades autoinmunes. Además, el proceso de apoptosis es un determinante crítico en la progresión de enfermedades microbianas, ya que si este proceso se logra inhibir en células infectadas por microorganismos intracelulares, estos tendrán un lugar donde replicarse y sobrevivir. Este es el caso de la infección causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, donde se ha demostrado mediante diversos ensayos *in vitro*, que las células infectadas por esta bacteria poseen una menor sensibilidad a estímulos apoptóticos.

En esta revisión se resumirán los aspectos moleculares que llevan a la muerte celular dada por apoptosis y se presenta cómo la bacteria intracelular *Rickettsia rickettsii* logra inhibir la apoptosis en las células que infecta.

Palabras clave: Autofagia, apoptosis, caspasas, muerte celular, *Rickettsia rickettsii*

Abstract

Cells are able to recognize the damage generated in its organelles and if this damage is irreparable, they initiate a process of programmed death cell called apoptosis. An aberrant regulation of apoptosis can lead to a pathological cell accumulation or an inappropriate loss of cells, which leads to autoimmune diseases. In addition, the process of apoptosis is a critical determinant in the progression of microbial diseases. If this process is inhibited in cells infected with intracellular microorganisms, they will replicate and survive. This is the case of the infection caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*, where various *in vitro* assays have proven that cells infected with this bacteria possess a lower sensitivity to apoptotic stimuli. Molecular aspects that lead to cell death by apoptosis will be summarized in this

review and it will also present how the intracellular bacterium *Rickettsia rickettsia* is able to inhibit apoptosis in the cells it infects.

Keywords: Autophagy, apoptosis, caspases, cell death, *Rickettsia rickettsii*

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular silenciosa donde la célula activa mecanismos que llevan a la desintegración celular en forma de cuerpos apoptóticos ⁽¹⁾. Estos cuerpos son reconocidos a través del receptor de fosfatidilserina por las células fagocíticas y son digeridos por heterofagia (vía fagocitosis o pinocitosis) sin causar inflamación ⁽¹⁾. Los eventos que sufre la célula durante este proceso incluyen: condensación de la cromatina, colapso del citoesqueleto, fragmentación nuclear, formación de los cuerpos apoptóticos y la fagocitosis de estos cuerpos por parte de macrófagos ⁽²⁾.

Este tipo de muerte celular es regulada por una maquinaria molecular que incluye proteasas de cisteína denominadas caspasas ⁽³⁾, las cuales tienen como sitio de corte residuos de aspartato y actúan sobre enzimas encargadas en la reparación del ADN, componentes del citoesqueleto y otras proteínas estructurales. Además, activan endonucleasas al actuar sobre proteínas que mantienen a estas caspasas en su forma inactiva ⁽⁴⁾.

Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras (-2, -8, -9, -10) y las efectoras (-3, -6, -7) ⁽⁵⁾.

Las caspasas iniciadoras se encargan de activar a las caspasas efectoras, al funcionar como catalizadoras de reacción (Figura 1. a). Una caspasa iniciadora puede activar a muchas caspasas efectoras. De este modo ocurre una cascada proteolítica, amplificándose el número de caspasas activas finales (Figura 1. b) ⁽⁶⁾. Esta cascada resulta ser destructiva, auto-amplificable e irreversible y su inicio se produce en respuesta a estímulos que disparan el proceso de la apoptosis ⁽⁴⁾.

Por otra parte, las caspasas iniciadoras son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína ⁽⁴⁾. Estas poseen un dominio reclutador de caspasas (CARD, por sus siglas en inglés), en el caso de las caspasas 2 y 9, que las habilita a ensamblarse con un adaptador de proteínas en un complejo activador cuando la célula recibe la señal apoptótica, o un dominio efector de la muerte (DED, por sus siglas en inglés), en el caso de las caspasas 8 y 10, que también permite la unión y asociación de estas caspasas con sus reguladores.

La proximidad en la cual se encuentran las caspasas promueve su activación; luego ellas mismas se escinden para hacer el proceso irreversible (Figura 1. c) ⁽⁴⁾.

Existen dos vías de señalización para iniciar la cascada de las caspasas: la vía intrínseca y la vía extrínseca ⁽⁷⁾.

La vía extrínseca está mediada por ligandos externos como TNF- α , FAS ligando y el ligando inductor de la apoptosis relacionado al TNF (TRAIL, por sus siglas en inglés) ⁽⁸⁾. Los

receptores FAS de estos ligandos tienen dominios de la muerte en las colas citosólicas, de tal forma que cuando se une el FAS ligando los dominios de la muerte, reclutan proteínas adaptadoras y estas a su vez reclutan procaspasas iniciadoras (8 y 10), formando un complejo inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés) ⁽⁹⁾. En este complejo las caspasas iniciadoras logran auto-activarse y luego activar a las caspasas ejecutoras (Figura 2. a) ⁽⁵⁾.

La vía intrínseca ocurre dentro de la célula en respuesta a daños en el ADN, estrés citotóxico, supresión del factor de crecimiento, falta de oxígeno o de nutrientes, un aumento en la cantidad de Ca^{2+} citosólico ⁽¹⁰⁾. Todas estas señales convergen en el evento pivote de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP, por sus siglas en inglés), lo que conlleva a la secreción de proteínas mitocondriales tales como citocromo c, el cual normalmente reside en la membrana interna de esta organela y al ser secretado se une a un adaptador activador de caspasas Apaf1, causando que este adaptador se oligomerice en un heptámero llamado apoptosoma ⁽¹¹⁾. El apoptosoma recluta a las procaspasas iniciadoras (-2 y -9), las cuales se activan por proximidad (tal y como la -8 y -10 son activadas en el DISC) (Figura 2. b) ⁽⁵⁾.

Figura 1. a) Las caspasas iniciadoras activas funcionan como catalizadoras de reacción para la activación de las caspasas efectoras.
b) Las caspasas iniciadoras activan a muchas caspasas efectoras. De este modo ocurre una cascada proteolítica, amplificándose el número de caspasas activas finales y estas caspasas efectoras actúan sobre enzimas encargadas en la reparación del ADN, componentes del citoesqueleto y otras proteínas estructurales. c) Las caspasas iniciadoras son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína que responden a la proximidad en la cual se encuentren estas caspasas

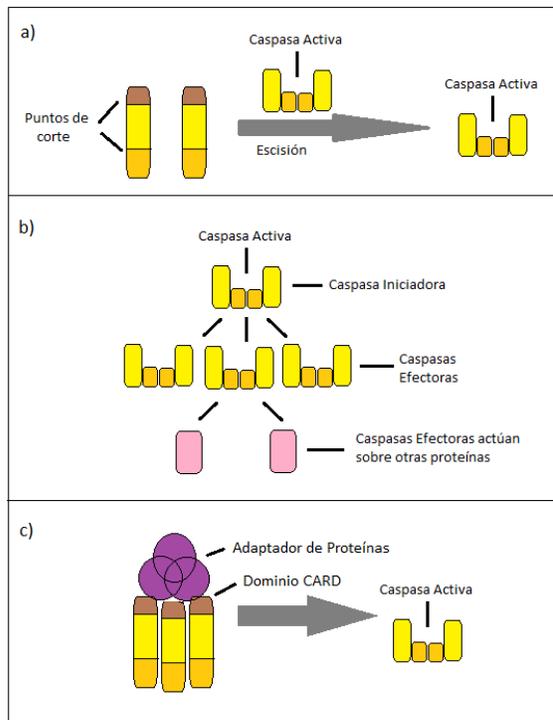
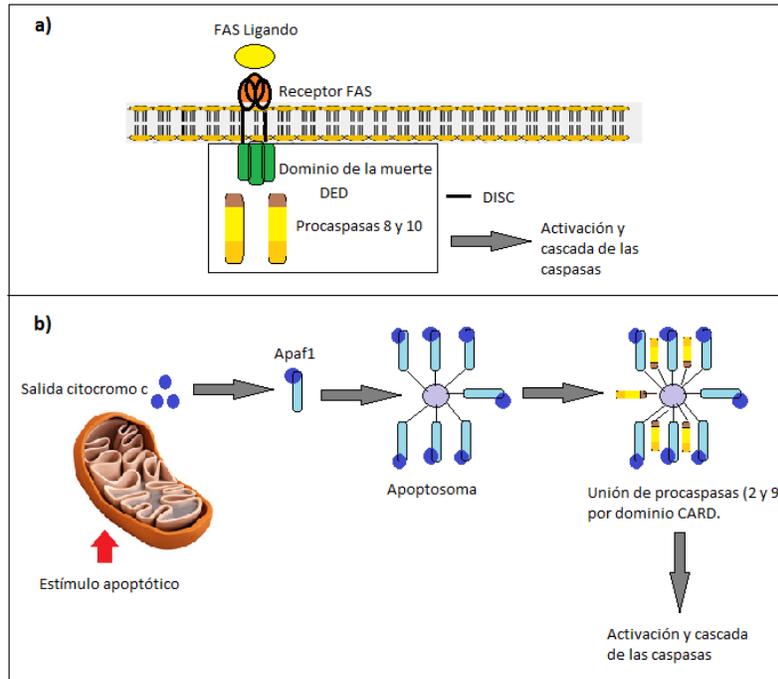


Figura 2. a) Vía extrínseca para activación de caspasas. Se une el FAS ligando con el receptor FAS y se da el reclutamiento de proteínas adaptadoras y procaspasas iniciadoras (8 y 10) formando un complejo inductor de muerte (DISC). Las caspasas iniciadoras logran autoactivarse y luego activan a las caspasas ejecutoras.
b) Vía intrínseca para activación de caspasas. Ocurre dentro de la célula en respuesta a un estímulo apoptótico. Se da la secreción de citocromo c y al ser secretado se une a un adaptador activador de caspasas Apaf1 causando que este se oligomerice en un heptámero llamado apoptosoma. El apoptosoma recluta a las procaspasas iniciadoras, las cuales se activan por proximidad.



La apoptosis es cuidadosamente regulada. En el caso de la vía extrínseca, los receptores de superficie *decoy* inhiben competitivamente a los receptores de la muerte; además, las proteínas bloqueadoras intracelulares FLIP (inhibidor celular proteico de FLICE) actúan sobre el dominio proteolítico, compitiendo con las procaspasas -8 y -10 en sitios de unión al DISC, inhibiendo así la activación de estas procaspasas ⁽⁴⁾.

En el caso de la vía intrínseca, existen proteínas pro-apoptóticas como la BH123 y la BH3 y anti-apoptóticas como la Bcl2 (célula B linfoma 2), las cuales controlan la salida del citocromo c de la mitocondria. El balance entre las actividades de estas dos clases de proteínas determina si la célula entra o no en apoptosis ⁽⁴⁾. Cuando hay un estímulo apoptótico, las proteínas pro-apoptóticas BH123 se agregan y se activan formando oligómeros en la membrana externa de la mitocondria, induciendo la salida de citocromo c. En ausencia de estos estímulos, la proteína Bcl2 se encarga de impedir la apoptosis al unirse a las proteínas pro-apoptóticas, inhibiendo así su función ⁽¹²⁾. Las proteínas BH3, promueven la apoptosis inhibiendo a las Bcl2, al unirse a ellas y neutralizando su actividad ⁽⁴⁾.

Algunas veces la vía extrínseca recluta a la intrínseca para amplificar la cascada de las caspasas. En estos casos, la proteína BH3 bid es el link entre estas vías, de manera que cuando se activan los receptores de la muerte en la vía extrínseca, la caspasa-8 escinde a bid formando tbid, el cual se transloca a la mitocondria y desde ahí inhibe a las proteínas anti-apoptóticas y promueve la agregación de proteínas pro-apoptóticas, para dejar salir al citocromo c y amplificar la señal de muerte celular ^(3, 12).

Inhibición de la apoptosis en células infectadas con *Rickettsia rickettsii*

La muerte celular por apoptosis es un determinante crítico en la progresión de infecciones microbianas y el desenlace de enfermedades ⁽¹³⁾. La eliminación de las células infectadas mediante apoptosis es uno de los mecanismos de defensa contra algunas infecciones microbianas ⁽¹⁴⁾. De tal forma que una apoptosis temprana limita la multiplicación del microorganismo y reduce o elimina su expansión y permanencia dentro del hospedero ⁽¹⁴⁾.

Algunos microorganismos intracelulares, tales como el virus del Papiloma Humano, virus Herpes Simplex, *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Chlamydia* y *Rickettsia rickettsii*, han adquirido la capacidad de inhibir la apoptosis en las células que infectan, evitando que la célula muera y continuando con su multiplicación ^(13, 14).

La bacteria *Rickettsia rickettsii* es un microorganismo intracelular obligado que invade y se multiplica en células endoteliales, causando daños en el endotelio vascular y desarrollando la enfermedad denominada Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas ⁽¹⁵⁾.

Durante la infección por esta bacteria, las células endoteliales activan el factor transcripcional NF- κ B, el cual regula el crecimiento celular, la comunicación intercelular, la migración celular y la amplificación de señales patogénicas ⁽¹⁶⁾.

Ensayos *in vitro* han demostrado que este factor transcripcional es capaz de inhibir la apoptosis durante la infección por *Rickettsia rickettsii*, por lo que la célula persiste como sitio de replicación bacteriana ⁽¹³⁾. De hecho, al inhibir la activación de este factor en células hospederas de la bacteria, estas células entran en apoptosis ⁽¹⁷⁾.

La activación del NF- κ B en cultivos celulares de células endoteliales humanas infectadas con *R. rickettsii* ha demostrado ser esencial para el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial, el aseguramiento del balance entre proteínas pro y anti apoptóticas y la prevención de la activación de la cascada de las caspasas ⁽¹⁸⁾.

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis 1 y 2 (cIAP1 y cIAP2, por sus siglas en inglés) son reguladas por el Factor Nuclear – κ B. Los niveles de cIAP2 y la expresión del ARNm de esta proteína se incrementan en células infectadas por *R. rickettsii* ⁽¹⁸⁾.

Bechelli *et al.* en el año 2009 utilizaron estaurosporina, un conocido inductor de la apoptosis, en células HMECs infectadas con *R. rickettsii* y determinaron que ante la presencia de este inductor se eleva aún más los niveles de cIAP2 y su ARNm; concluyendo que esta elevación aporta un efecto citoprotector sobre la célula. Con su investigación también determinaron que los niveles positivos de anexina V (un marcador temprano de la apoptosis) en células

infectadas con *R. rickettsii* es significativamente menor que en los cultivos celulares sin infectar pero expuestos a la estaurosporina; concluyendo que la infección por *Rickettsia rickettsii* en células HMECs protege contra la apoptosis ⁽¹²⁾.

La inhibición de la apoptosis en células infectadas por *R. rickettsii* es un tema multifactorial cuyo estudio ha quedado rezagado en comparación con el de otras bacterias como *Anaplasma* y *Chlamydia*. Por ello, las investigaciones en este tema siguen la línea de lo ya descrito para algunas de estas bacterias como *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydofila pneumoniae*, bacterias que han demostrado resistencia a estímulos proapoptóticos directos como el factor de necrosis tumoral α , anticuerpo anti-Fas y la perforina granzima B ⁽¹⁹⁾.

En células infectadas con *Chlamydia trachomatis* por ejemplo, no solo se ha determinado la sobreexpresión de cIAP2, sino también de otras proteínas inhibidoras de la apoptosis como el cIAP1 y XIAP. Aunado a esto, se ha descrito la degradación proteolítica de proteínas proapoptóticas BH3 ⁽²⁰⁾.

En este contexto y comprendiendo que existen múltiples factores involucrados en la inhibición de la apoptosis en las infecciones microbianas, resulta importante conocer con claridad los aspectos moleculares relacionados con este proceso, cómo se regula y cuáles interacciones existen entre esta y otros procesos de muerte celular como la autofagia, con el fin de dilucidar mediante experimentación y herramientas bioinformáticas, cómo influye *Rickettsia rickettsii* sobre todas estas vías y así poder comprender mejor su patogénesis.

Referencias

1. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2007 Octubre; p. 767-777.
2. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: p. 770-776.
3. Nunez G, Benedict M, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998; 17: p. 3237-3245.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. Fifth Edition ed.: Garland Publishing; 2008. p. 1115-1128.
5. Haijian W, Xiaoru C, Zeng Q, Wu A, Pan K, Shao A, et al. Caspases: A molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*. 2014; 10(9): p. 1072-1083.
6. Riedl S, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004; 5: p. 897-907.
7. Taylor R, Cullen S, Martin S. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008; 9: p. 231-241.
8. Sayers T. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 2011; 60: p. 1173-1180.
9. Kaufmann T, Strasser A, Jost P. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation*. 2012; 19: p. 42-50.
10. Franklin J. Redox regulation of intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2011; 14: p. 1437-1448.

11. Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik S, et al. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: p. 8091-8098.
12. Harris M, Thompson C. The role of Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell death and differentiation*. 2000; 7: p. 1182-1191.
13. Joshi S, Francis C, Silverman D, Sahni S. *Infection and Immunity*. 2003 July; 71(7): p. 4127-4136.
14. Xingchen Z, Wenbo j, Zhongshun L, Shuai L, Xiaozhen L. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses*. 2017 Octubre; 9(316).
15. Valbuena G, Feng H, Walker D. Mechanisms of immunity against rickettsiae: New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes Infection*. 2002 Mayo; 4(6): p. 625-633.
16. McEwan D. Host-pathogen interactions and subversion of autophagy. *Essays Biochemistry*. 2017 Diciembre; 61(6): p. 687-697.
17. Clifton D, Goss R, Sahni S, van Antwerp D, Baggs R, Marder V, et al. NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proceedings of the National Academy of science*. 1998 Abril; 95(8): p. 4646-4651.
18. Bechelli J, Rydkina E, Punsiri C, Sahni S. *Rickettsia rickettsii* Infection Protects Human Microvascular Endothelial Cells against Staurosporine-Induced Apoptosis by a cIAP2-Independent Mechanism. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009 Mayo; 199: p. 1389-1398.
19. Rajalingam K, Al-Younes H, Muller A, Meyer T, Szczepek A, Rudel T. Epithelial Cells Infected with *Chlamydomphila pneumoniae* are Resistant to Apoptosis. *Infection and Immunity*. 2001 Diciembre; 69(12): p. 7880-7888.
20. Ying S, Christian J, Paschen S, Hacker G. *Chlamydia trachomatis* can protect host cells against apoptosis in the absence of cellular inhibitor of apoptosis proteins and Mcl-1. *Microbes Infection*. 2008 Enero; 10(1): p. 97-101.