



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Smac/DIABLO  
DURANTE LA APOPTOSIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**GISELA CEBALLOS CANCINO**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS**

México, D. F.

Noviembre 2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

La vía intrínseca de la apoptosis se caracteriza por la liberación de diversas proteínas localizadas en el espacio intermembranal de la mitocondria al citosol, como son citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonucleasa G y AIF. Smac/DIABLO (segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína de unión directa IAPs de bajo punto isoeléctrico) potencia la apoptosis al unirse a las IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis) y neutralizar su acción inhibitoria sobre las caspasas. La interacción de Smac/DIABLO con las IAPs induce la degradación del primero debido a la actividad ligasa de ubiquitina E3 del dominio RING de la IAP. Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación transcripcional de Smac/DIABLO. La liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria es considerada como el principal mecanismo de regulación de la actividad de esta proteína, pero no es claro el mecanismo exacto por el cual se lleva a cabo este proceso. Las diferencias observadas en la modulación de Smac/DIABLO podrían ser el resultado de las diferentes señales inducidas por los diversos estímulos empleados.

Para profundizar en el estudio de la regulación de Smac/DIABLO durante la apoptosis se utilizaron cuatro estímulos que indujeran la vía intrínseca de la apoptosis: ausencia de suero, taxol, etopósido y estaurosporina. Se analizaron los niveles de ARN mensajero y proteína de Smac/DIABLO. Adicionalmente se analizó por Western blot la liberación mitocondrial de Smac/DIABLO inducida por estos agentes. Además se verificó la participación de la familia de Bcl-2, las caspasas y las IAPs en el mecanismo de liberación mitocondrial de Smac/DIABLO. Se utilizaron ARNs de interferencia y sistemas de sobreexpresión para evaluar la participación de la Survivina en la regulación de Smac/DIABLO, y el consecuente efecto sobre la muerte celular.

En este trabajo los niveles de ARN mensajero y proteína de Smac/DIABLO se regularon diferencialmente dependiendo del estímulo apoptótico. Los miembros de la familia IAP también se modularon diferencialmente. El etopósido indujo la regulación positiva post transcripcional de Survivina y de la isoforma Survivina DEx3. La Survivina, y en una menor extensión, la Survivina DEx3 regularon la liberación específica de Smac/DIABLO durante la apoptosis inducida por este agente antineoplásico. A su vez, la Survivina mitocondrial asociada a Smac/DIABLO retrasó su liberación. Adicionalmente, la Survivina citosólica estabilizó los niveles citosólicos de Smac/DIABLO liberado. Estos resultados proporcionan una explicación para las diferencias observadas en la liberación de proteínas mitocondriales en varios modelos apoptóticos y presenta un nuevo mecanismo para los efectos anti-apoptóticos de la Survivina en células de cáncer. Así podemos concluir que la Survivina es un regulador importante de la actividad de Smac/DIABLO durante la apoptosis inducida por etopósido.

## SUMMARY

The intrinsic apoptotic pathway is characterized by the release of several mitochondrial intermembrane proteins into the cytosol, like cytochrome c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, Endonuclease G and AIF. Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein of low pI) potentiates apoptosis by binding IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) and neutralizing their inhibitory activity on caspases. The interaction between Smac/DIABLO and IAPs induces the proteosomal degradation of the former, due to the E3 ubiquitin ligase activity of the RING domain in the IAP. The transcriptional regulation of Smac/DIABLO has been far less studied. Nevertheless, release from mitochondria is considered the main regulatory step of Smac/DIABLO activity, although the precise mechanism is still unclear. It has been reported that Smac/DIABLO is released together with cytochrome c as well as independently. This discrepancy might be the result of the utilization of different apoptotic stimuli that mediate additional signals.

To gain more insight into the regulation of Smac/DIABLO during apoptosis, we chose four death stimuli that engage the intrinsic pathway: serum deprivation, taxol, etoposide and staurosporine. Modulations of mRNA and protein levels of Smac/DIABLO were investigated. Mitochondrial release induced during cell death was analyzed by Western blot. We also assessed the participation of Bcl-2, caspases and IAPs in the Smac/DIABLO mitochondrial release mechanism. Additionally, interference RNA assays and overexpression studies were carried out to evaluate survivin participation in Smac/DIABLO regulation and modulation of apoptosis.

Smac mRNA and protein modulation was stimulus dependent. IAP family members were also differentially modulated. Etoposide induced posttranscriptional upregulation of survivin, and the survivin splice variant survivin DEx3. Survivin and, to a lesser extent, Survivin DEx3 regulated the specific liberation of Smac/DIABLO during apoptosis induced by this antineoplastic drug. In turn, mitochondrial Survivin associated with Smac/DIABLO, delaying its release. In addition, cytosolic Survivin also stabilized the cytosolic levels of released Smac/DIABLO. These results provide an explanation for the observed differences in the release of mitochondrial intermembrane proteins in various apoptotic models and present a new mechanism for the anti-apoptotic effects of survivin in cancer cells. In conclusion, in the present report we show that survivin is a key regulator of Smac/DIABLO differential release from mitochondria during apoptosis induced by DNA damage.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios,*

Por poner en mí camino a las personas que han compartido conmigo cada etapa de mi vida.

*A mis padres,*

Por su amor, apoyo incondicional y confianza en mí. Por impulsarme a seguir siempre adelante. Por enseñarme el valor del trabajo y el esfuerzo. Por ser siempre un ejemplo a seguir, sin ustedes no sería la persona que ahora soy.

*A mi hermano, Gibrán,*

Por estar siempre a mi lado y enseñarme el camino. Estoy muy orgullosa de ti. Deseo de todo corazón que sigamos compartiendo todos nuestros momentos.

*A mi esposo, Salomón,*

Por estar a mi lado en todo momento, por su apoyo, comprensión, consejos, paciencia y amor. No habría sido lo mismo sin ti.

*A toda mi familia,*

Por su cariño y apoyo. Por darme siempre ánimos.

*A mis tutores, Drs. Vilma y Jorge,*

Por darme la oportunidad de realizar mis estudios con ellos. Por compartir conmigo sus conocimientos y enseñanzas. Por su apoyo en todo momento.

*A mi cotutor, Dr. Enrique,*

Por sus comentarios que enriquecieron este trabajo. Por su apoyo y sus consejos.

*A mis amigos del Laboratorio, Magali, Floria, Abril, Juan Carlos, Ingrid, Julia.*

Por su siempre grata compañía, en las buenas y en las malas. Por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia y sus consejos.

Por ser parte de mi familia.

# INDICE

	página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
Apoptosis	3
Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs)	7
Survivina	10
Papel en el ciclo celular	11
Papel en la apoptosis	11
Distribución subcelular y capacidad apoptótica de la survivina y sus isoformas	12
Smac/DIABLO	15
Expresión en cáncer	15
Liberación mitocondrial de Smac	16
Isoformas de Smac	18
Mecanismo de interacción con las IAPs	19
Efecto de la interacción con las IAPs	20
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
General	23
Específicos	23

V. METODOLOGÍA	24
Línea celular	24
Cultivo celular	24
Determinación de la dosis letal media (LD50)	24
Viabilidad celular. Cristal violeta	24
Tinción con bromuro de etidio	25
Extracción de proteínas totales	25
Extracción de proteínas citosólicas y mitocondriales	25
Western blot	26
Extracción de ARN total	26
Síntesis de ADN complementario (RT)	27
Reacción en cadena de la polimerasa	27
Análisis densitométrico	30
Clonación de las isoformas de Smac	30
Inhibición de p34cdc2	30
Inhibición del proteosoma con MG132	31
Clonación de la secuencia de Bcl-2 en antisentido	31
Transfección estable	31
Extracción de proteínas nucleares y citosólicas	31
ARN de interferencia para Survivina y Survivina DEx3	32
Transfección transitoria	32
Sobreexpresión de la Survivina	33
Análisis estadístico	33
VI. RESULTADOS	34
Inducción de apoptosis en células HeLa	34
Liberación de citocromo c y Smac durante la apoptosis	38
Regulación de los niveles de Smac durante la apoptosis	38
Participación de las IAPs en modulación de los niveles de Smac	40
Liberación mitocondrial de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina	42
Participación de la familia de Bcl-2 y de las caspasas en la	

liberación de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido	44
Regulación de la expresión y distribución subcelular de la Survivina durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina	47
Participación de la Survivina en la regulación de la liberación mitocondrial de Smac	49
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
Apoptosis mitocondrial en células HeLa	54
Regulación de los niveles de Smac durante la apoptosis	56
Participación de las IAPs en la modulación de los niveles de Smac	57
Etopósido y estaurosporina inducen diferentes cinéticas de liberación de Smac y citocromo c	59
Participación de la familia de Bcl-2 y las caspasas en la liberación de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido	60
Expresión y distribución subcelular de la Survivina durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina	61
Participación de la Survivina en la regulación de la liberación mitocondrial de Smac	62
Isoformas de Smac	64
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO 1. ABREVIATURAS	81
ANEXO 2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTÍMULOS APOPTÓTICOS	83
ANEXO 3. ISOFORMAS DE SMAC	85
ANEXO 4. ARTÍCULO	89



## I. INTRODUCCIÓN

Las células tumorales presentan defectos en su maquinaria apoptótica que les permite sobrevivir en condiciones anormales con la posibilidad de ir acumulando mutaciones y adquiriendo resistencia a microambientes adversos incluyendo la exposición a drogas antineoplásicas.

Los defectos en la maquinaria apoptótica pueden ser causa de cambios en las proteínas que regulan los mecanismos apoptóticos. Una proteína proapoptótica importante es Smac/DIABLO, cuyos niveles se encuentran desregulados en diversos tipos de cáncer (Yoo *et al.*, 2003; Sekimura *et al.*, 2004; Mizutani *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2005). Los niveles en los que se ha observado esta expresión alterada han sido a nivel de ARN mensajero y de proteína, lo cual indica que existen diferentes niveles de regulación.

Un nivel de regulación es el balance entre los niveles de proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs) y los niveles de la proteína Smac. Varios miembros de la familia IAP se han encontrado sobre expresados en cáncer (Salvesen y Duckett, 2002), y esta sobre expresión esta asociada a una resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos (Hong *et al.*, 2003).

Otro nivel de regulación muy importante y poco estudiado es la capacidad de liberación de la proteína Smac/DIABLO de la mitocondria en células de cáncer bajo diversos estímulos. Este nivel de regulación es clave ya que la proteína Smac/DIABLO madura, capaz de ejercer su función proapoptótica, se encuentra dentro de la mitocondria, y su liberación al citosol le permite interactuar con las IAPs e inhibir su función. Existen algunos estudios que demuestran que la familia de Bcl-2 y la vía de JNK regulan la salida de Smac/DIABLO de la mitocondria al citosol; sin embargo, aún no se comprende completamente este mecanismo. Una vez en el citoplasma su actividad y niveles son determinados por las diversas IAPs (Vaux y Silke, 2005).

Para profundizar en este aspecto se seleccionaron dos estímulos apoptóticos de la vía mitocondrial; el etopósido, un veneno de topoisomerasa II que incrementa la frecuencia y duración de los cortes del ADN, lo que resulta en cortes permanentes en la doble hebra que son letales para la célula (Robertson *et al.*, 2000), y la estaurosporina, el cual es un agente inhibidor de cinasas no selectivo. Ambos estímulos inician la apoptosis por mecanismos diferentes pero coinciden en activar la vía mitocondrial y producir liberación de citocromo c y activación de caspasas. Sin embargo, se desconoce si el comportamiento de las diferentes IAPs y de la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO es el mismo en los dos procesos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular que está conservado entre las especies. Es importante durante el desarrollo embrionario para asegurar la organogénesis, y en la etapa adulta para el mantenimiento de la homeostasis celular (Danial y Korsmeyer, 2004). La homeostasis se mantiene a través del balance entre los procesos de proliferación y muerte celular. La alteración de este balance está implicada en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes, el SIDA, desórdenes neurodegenerativos y síndromes mielodisplásicos (Thompson *et al.*, 1995).

Las células apoptóticas presentan una morfología característica, que consiste en una disminución en el volumen celular, pérdida de contacto con células vecinas, condensación nuclear, fragmentación del ADN en segmentos de tamaño oligonucleosomal y la formación de unas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos que contienen organelos intactos. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas o fagocitos, impidiendo así una respuesta inflamatoria. Todos estos eventos que resultan en la morfología apoptótica son ocasionados por una familia de proteasas, denominadas caspasas, que son las principales ejecutoras de la apoptosis (Elinos-Báez *et al.*, 2003; Kroemer *et al.*, 2005).

Estas proteínas forman parte de una familia de proteasas de cisteína que cortan después de un residuo de aspartato. Estas proteasas son producidas en la célula como zimógenos inactivos denominados procaspasas y se activan por corte proteolítico durante la apoptosis. Las caspasas que participan en la apoptosis se dividen en dos grupos, las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) que tienen la capacidad de autoactivarse, y las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7), las cuales tienen que ser activadas por las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras activas son las responsables del corte proteolítico de una amplia gama de sustratos en la célula que finalmente conduce a la muerte celular (Shi *et al.*, 2002).

Se conocen dos vías por las cuales puede llevarse a cabo el proceso apoptótico dependiente de caspasas: la vía extrínseca y la vía intrínseca, las cuales se presentan en la Figura 1.

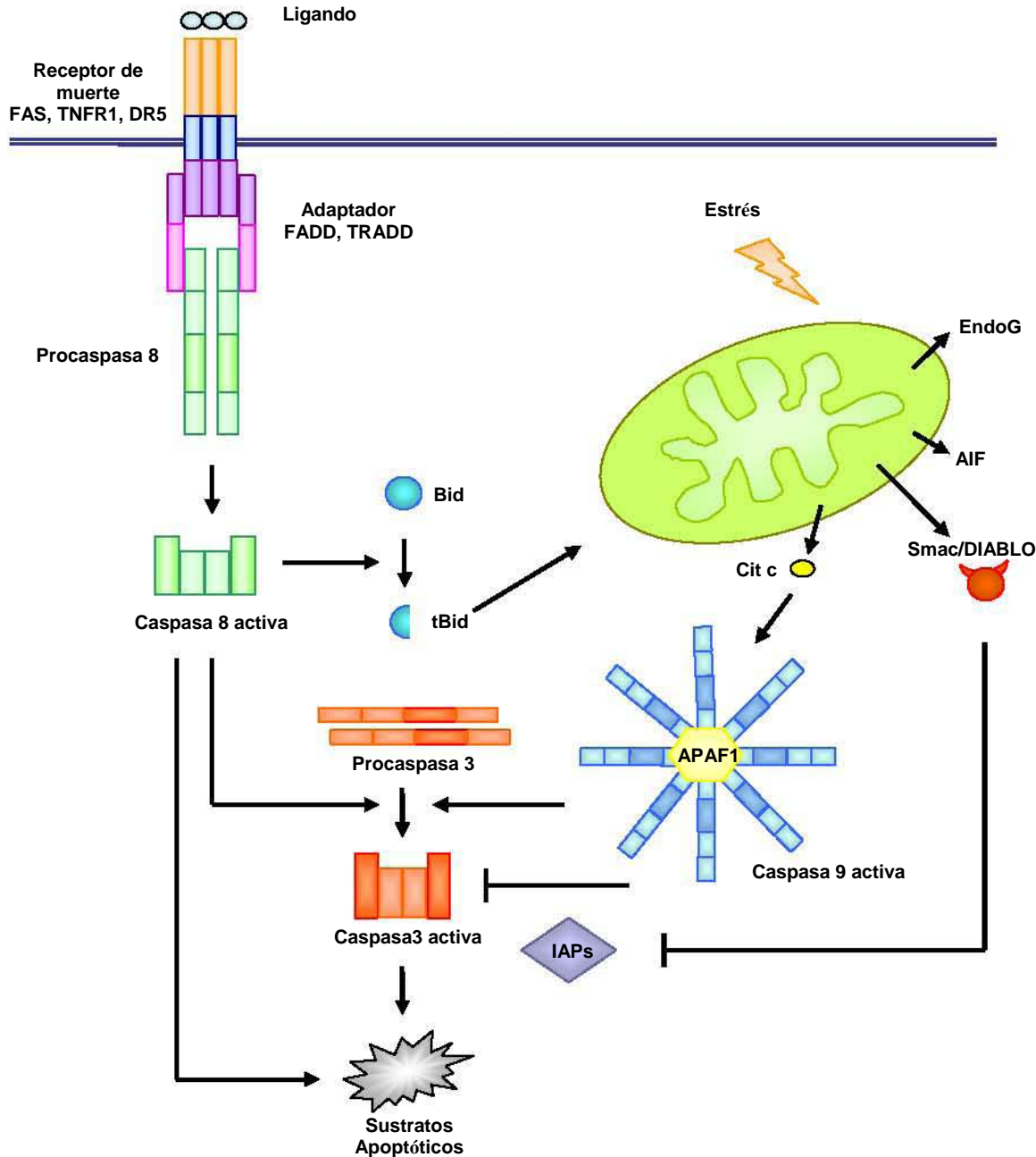


Figura 1. Esquema de las vías apoptóticas. La vía extrínseca mediada por los receptores de muerte, y la vía intrínseca, en donde participa activamente la mitocondria. Ambas vías convergen en la activación de caspasas. (Modificado de Altieri, 2003).

La vía extrínseca se lleva a cabo por los receptores membranales de muerte, que forman parte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral los cuales se caracterizan por poseer un dominio de muerte. Estos receptores, una vez que unen al ligando, trimerizan, conduciendo a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que puede estar conformado de distinta manera dependiendo del receptor. En el caso del receptor de muerte Fas, una vez unido el ligando de Fas, se recluta en el lado citoplásmico del receptor a la proteína FADD a través de sus dominios de muerte (DDs). El otro extremo de FADD contiene dos dominios efectores de muerte (DEDs) los cuales pueden unir a la caspasa 8. Cuando la caspasa 8 es reclutada se activa por corte proteolítico, y una vez activa puede activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Bridgham *et al.*, 2003).

La caspasa 8 también puede cortar a un miembro de la familia de Bcl-2, Bid, el cual se dirige a la mitocondria en donde inhibe a Bcl-2 y permite la salida de factores proapoptóticos, amplificando la señal de muerte al activar así la vía intrínseca de la apoptosis (Luo *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1998). También se ha visto que la caspasa 8 puede activarse por drogas quimioterapéuticas, estrés oxidativo, químicos citotóxicos y radiación ionizante o ultravioleta (UV) (Chandra *et al.*, 2004).

La vía apoptótica extrínseca puede ser regulada por la familia de proteínas c-FLIP las cuales poseen también dominio efector de muerte y compiten con la caspasa 8 por su unión al DISC (Krueger *et al.*, 2001; Peter, 2004; Golks *et al.*, 2005). También puede ser regulada por la familia de proteínas denominadas CARPs, las cuales regulan negativamente a las caspasas iniciadoras al enviarlas a degradación por la vía del proteosoma (McDonald y El-Deiry, 2004).

La otra vía apoptótica es la intrínseca, también llamada vía mitocondrial, debido al importante papel que tiene este organelo en el proceso apoptótico. La mitocondria percibe el estrés celular provocado por luz UV, agentes quimioterapéuticos y daño al ADN. Básicamente, esta vía se inicia con la

permeabilización de la membrana mitocondrial externa por medio de los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, y en consecuencia, la liberación de diversas proteínas del espacio intermembranal al citosol. Una proteína muy importante es citocromo c. Una vez en el citosol se une a Apaf-1, la cual cambia su conformación y se oligomeriza, para posteriormente reclutar a la caspasa 9 y permitir su activación. Este complejo multiprotéico es llamado apoptosoma. La caspasa 9 entonces procesa y activa a las caspasas efectoras 3 y 7 (Green, 2005).

En la mitocondria residen diversas proteínas proapoptóticas que se liberan al citosol durante el proceso de muerte celular. Una de ellas es el factor AIF, que en respuesta a un estímulo apoptótico se transloca al núcleo, donde causa la fragmentación del ADN y apoptosis en una forma independiente de caspasas. De la mitocondria también se liberan las proteínas Smac/Diablo y la proteasa de serina Omi/HtrA2. Estas proteínas facilitan la activación de las caspasas al inactivar a los inhibidores endógenos de las caspasas, las IAPs (van Loo *et al.*, 2002).

Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas son liberadas de la mitocondria, pero prevalecen tres modelos. Primero, por la formación de un poro o canal por miembros de la subfamilia de Bax, que oligomerizan en la membrana mitocondrial externa para formar un poro de tamaño suficiente para permitir la salida de las proteínas del espacio intermembranal. Segundo, por medio del poro de transición de la permeabilidad (PTP), el cual está formado por varias proteínas como las VDAC localizadas en la membrana externa, ANT localizada en la membrana interna y ciclofilina D, entre otras. El PTP se abre en condiciones de estrés oxidativo, niveles elevados de  $Ca^{+2}$  y bajos niveles de ATP. Esto permite un incremento en la entrada de solutos pequeños a través de la membrana mitocondrial interna, colapso del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y pérdida de ATP. La entrada de solutos conduce al hinchamiento de la matriz mitocondrial, expansión de la membrana interna y finalmente, a la ruptura de la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación no específica de proteínas. Tercero, la formación de poros de mayor tamaño que resultan de la asociación de miembros

proapoptóticos de la familia de Bcl-2 con componentes del PTP (Martinou y Green, 2001).

Por lo tanto, los principales reguladores de la vía mitocondrial son las proteínas de la familia Bcl-2, ya que pueden suprimir o promover cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial requerida para la liberación de las proteínas de la mitocondria. Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer al menos un dominio de homología Bcl-2 (BH). Esta familia posee miembros antiapoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-xL, y dos grupos de proteínas proapoptóticas: la familia Bax, entre las que se encuentran Bax y Bak; y la familia "solo BH3" con miembros como Bid, Bim y Bad. Los miembros antiapoptóticos mantienen la integridad de la mitocondria, mientras que los miembros de la familia "solo BH3" actúan como sensores del daño y antagonizan directamente a los antiapoptóticos. La familia Bax actúa en la mitocondria, ya que sus miembros oligomerizan en la membrana mitocondrial externa y contribuyen a la permeabilización de la mitocondria (Cory y Adams, 2002).

Ambas vías apoptóticas convergen en la activación de caspasas, que son las principales ejecutoras de la muerte celular, por lo cual estas proteínas deben ser reguladas estrictamente. Una familia de reguladores muy importante es la familia IAP.

### **PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS (IAPs).**

Estas proteínas fueron descubiertas primero en baculovirus, donde suprimían la respuesta apoptótica defensiva de los insectos huésped para incrementar la infección viral, y posteriormente fueron descritas en insectos y vertebrados (Deveraux y Reed, 1999). Se caracterizan por poseer de uno a tres dominios BIR de aproximadamente 70 aminoácidos. Algunos miembros de esta familia poseen otros dominios, como el RING y/o el CARD (Deveraux y Reed, 1999; Verhagen *et al.*, 2001).

Las IAPs unen e inhiben a las caspasas por medio de sus dominios BIR. Específicamente, a la caspasa iniciadora 9 por el tercer dominio BIR (BIR3), y a las caspasas efectoras 3 y 7 por la región intermedia entre los BIR1 y BIR2. Esta interacción bloquea la entrada del sustrato en las caspasas, inhibiendo así su actividad enzimática. Cabe mencionar que esta inhibición es altamente específica (Shi, 2002).

Se ha sugerido que el dominio RING también participa en la regulación de las caspasas. Este dominio tiene actividad de ligasa de ubiquitina (E3), y de esta manera puede enviar a degradación a las caspasas unidas, aunque esto solo ha sido visto *in vitro*. Pero no solo regulan a las caspasas; también hay otras proteínas blanco y hasta la misma IAP puede autoubiquitinarse y degradarse por la vía del proteosoma (Vaux y Silke, 2005).

A la fecha se han descrito ocho IAPs en mamíferos (Figura 2), también conocidas como BIRCs (proteínas que contienen BIR) y se les ha numerado por el orden en que fueron descritas (Verhagen *et al.*, 2001; Salvesen y Duckett, 2002).

XIAP ha sido la más estudiada y es considerada como la más potente inhibidora de caspasas entre las IAPs, ya que posee una gran afinidad hacia ellas; inhibe a las caspasas 9, 3 y 7. En base a los estudios de estructura-función de XIAP se ha establecido el modelo de inhibición de caspasas, que se sugiere es el mismo para las demás IAPs, debido a lo similar de sus estructuras (Salvesen y Duckett, 2002). cIAP-1 y cIAP-2 fueron identificadas en el complejo de señalización del receptor de TNF tipo II y reducen la activación de la caspasa 8, pero no la inhiben directamente. Sin embargo, inhiben a las caspasas 3 y 7 (Verhagen *et al.*, 2001; Salvesen y Duckett, 2002).

ML-IAP se encuentra en niveles elevados en varias líneas celulares de cáncer, pero particularmente en líneas celulares de melanoma. Aunque posee solo un dominio BIR se ha observado que puede inhibir a las caspasas 9, 3 y 7 (Verhagen *et al.*, 2001). NAIP puede inhibir algunos procesos de muerte celular, pero su único



dominio BIR no está muy relacionado con los BIRs de las demás IAPs. Sus funciones exactas aún se desconocen (Verhagen *et al.*, 2001). ILP-2 posee sólo un dominio BIR, y puede inhibir a la caspasa 9 (Richter *et al.*, 2001). BRUCE es una proteína muy grande de 582 kDa que se encuentra en el Golgi, posee sólo un dominio BIR y en el carboxilo terminal tiene otro dominio con actividad de enzima conjugadora de ubiquitina (E2) (Hauser *et al.*, 1998). Recientemente se reportó que a través de este único BIR puede inhibir a la procaspasa 9 (Qiu y Goldberg, 2005).

Finalmente, la Survivina es una de las IAPs más interesantes, debido a que se encuentra sobre expresada prácticamente en todos los tumores humanos analizados, mientras que su expresión es casi indetectable en tejidos sanos. Tiene una doble función; en la inhibición de la apoptosis y en la progresión de varias etapas de la mitosis (Altieri, 2003). No hay duda de que la Survivina es una proteína inhibidora de apoptosis, pero el mecanismo exacto de esta inhibición no ha sido aclarado.

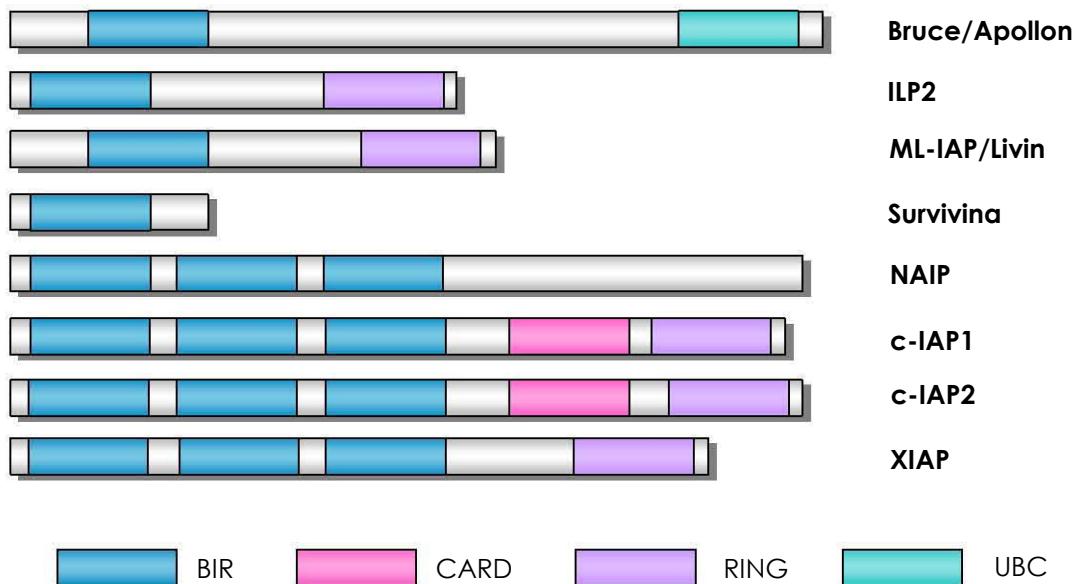


Figura 2. Estructura de los miembros de la familia IAP. (Tomado de Verhagen *et al.*, 2001).

## **SURVIVINA**

La Survivina es el miembro más pequeño (16.5 kDa) de la familia IAP. Solo posee un dominio BIR y una región carboxilo terminal extendida de alfa hélices tipo "coiled-coil" (bucles superenrollados). Esta proteína está presente durante el desarrollo fetal, y es casi indetectable en los tejidos adultos diferenciados. Sin embargo, se encuentra altamente expresada en líneas celulares transformadas y en los cánceres humanos más comunes (Ambrosini *et al.*, 1997).

La expresión de la survivina depende de la etapa del ciclo celular, presentando una expresión incrementada en la fase G2/M y un rápido declive en la fase G1 (Li, *et al.*, 1998). Esta expresión está regulada a nivel transcripcional por las cajas CDE/CHR presentes en el promotor de survivina (Altieri, 2003). Además, cambios en la estabilidad de la proteína participan en la regulación de su expresión. En células en interfase se ha observado una poliubiquitinación y degradación de la survivina por la vía del proteosoma, y esto es dependiente de una región carboxilo terminal intacta río abajo del dominio BIR (Zhao *et al.*, 2000). También se ha visto que la estabilidad de la proteína aumenta durante la metafase debido a la fosforilación de survivina en la treonina 34 por el complejo ciclina B1/cdc2 (O'Connor *et al.*, 2002).

En estudios de perfiles de genes, la survivina fue identificada como el cuarto transcrito expresado en la mayoría de los cánceres humanos más comunes, pero no en los tejidos normales (Altieri, 2003). Se ha sugerido que el gen de survivina está desregulado globalmente en las células transformadas, ya que se encuentra sobre expresado en todas las etapas del ciclo celular, no solo en la mitosis. Diversos eventos involucrados en el proceso carcinogénico han sido implicados en la desregulación de la survivina, como la amplificación del locus de survivina en neuroblastoma, la desmetilación selectiva del exón 1 de survivina en cáncer de ovario pero no en ovarios normales, e importantemente, también en células sin p53 silvestre. La survivina ha sido identificada como uno de los genes reprimidos transcripcionalmente por p53 silvestre, a través de un elemento bipartito de

respuesta a p53 en el promotor de la survivina, o por cambios en la estructura de la cromatina que afectan la accesibilidad al promotor (Altieri, 2003).

### **Papel en el ciclo celular.**

Existe evidencia que sugiere que la survivina tiene un importante papel en la mitosis. La inhibición de su expresión, utilizando antisentidos o mutantes dominantes negativos, resulta en un fenotipo apoptótico y de mitosis aberrante, con numerosos centrosomas, husos mitóticos multipolares, multinucleación y fallas en la citocinesis. Además se ha sugerido que la Survivina podría participar en múltiples etapas de la división celular, debido a su interacción con INCENP (proteína interna del centrómero) y la cinasa Aurora B (proteínas pasajeras cromosomales), que podría regular la estabilidad de los microtúbulos en la formación del huso en metafase, y regular el “checkpoint” (punto de comprobación) del ensamblado del huso (Altieri, 2004).

### **Papel en la apoptosis.**

La survivina tiene la capacidad de unir e inhibir directamente a las caspasas efectoras 3 y 7 (Shin *et al.*, 2001) e indirectamente a la caspasa 9, ya que como intermediario requiere a la proteína HBXIP, para unir a esta caspasa e impedir su unión a Apaf-1, y en consecuencia su activación (Marusawa *et al.*, 2003).

Sin embargo, se ha sugerido que la survivina tiene un papel más selectivo para inhibir la apoptosis mitocondrial. Cuando la expresión de la survivina ha sido inhibida, la muerte celular tiene características de la vía intrínseca, como la liberación de citocromo c, la activación de la caspasa 9, el requerimiento de componentes del apoptosoma (Altieri, 2003), la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (Altieri, 2004), así como la translocación de AIF al núcleo (Liu *et al.*, 2004). Además, ratones heterocigotos para *survivina* mostraron ser más sensibles a la muerte dependiente de la mitocondria (Altieri, 2003).

## Distribución subcelular y capacidad apoptótica de la survivina y sus isoformas.

A la fecha se han reportado cinco isoformas de la survivina generadas por splicing alternativo (Figura 3). La distribución subcelular y la capacidad apoptótica entre las isoformas varía.

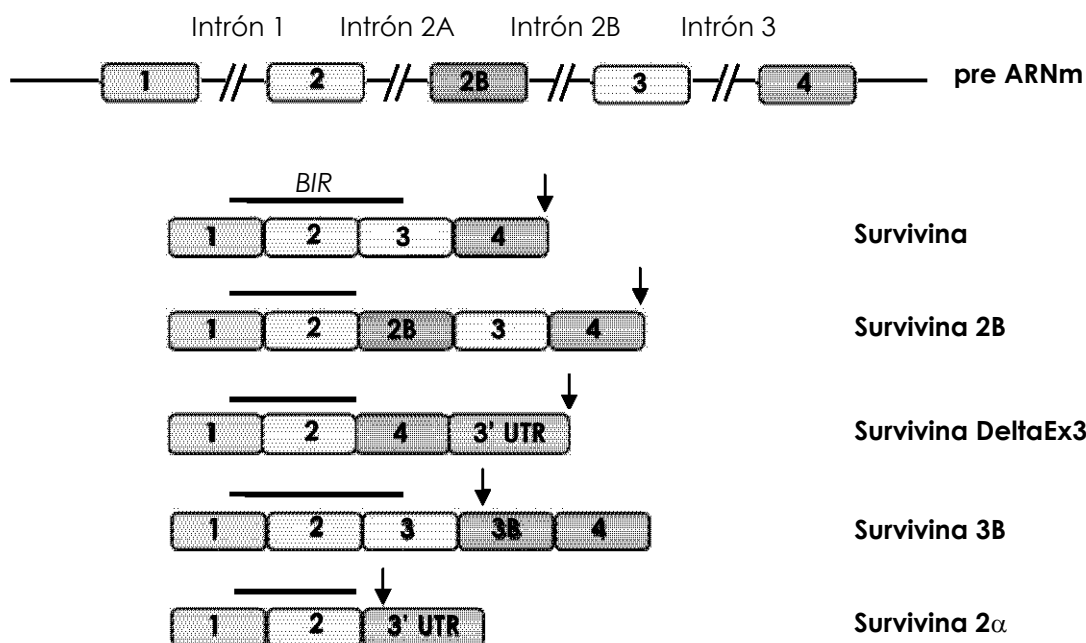


Figura 3. Estructura de la Survivina y sus isoformas. Los exones están representados por los cuadros. La extensión del dominio BIR está representado por una línea negra, y la flecha indica el codón de paro. (Tomado de Caldas *et al.*, 2005).

La **survivina tipo** tiene una estructura de 4 exones y 3 intrones, y se le ha descrito como una isoforma principalmente citosólica, en una relación 6:1 de survivina citosólica contra nuclear. La survivina nuclear se localiza en los cinetocoros de los cromosomas en metafase y en la zona media del huso en anafase. En contraste, la población citosólica se encuentra asociada a los microtúbulos de la interfase, los centrosomas, los polos del huso y los microtúbulos del huso mitótico en la metafase y la anafase (Fortugno *et al.*, 2002). Se sabe que

la región carboxilo terminal es la que le permite a la survivina asociarse a la tubulina (Li *et al.*, 1998). La survivina citosólica esta asociada también con cdc2 y se fosforila en la treonina 34, mientras que la nuclear no (Fortugno *et al.*, 2002). Se ha observado que esta fosforilación de la survivina es necesaria para su interacción con la caspasa 9 y la inhibición de la apoptosis dependiente de esta caspasa (O'Connor *et al.*, 2000). También se ha descrito una población mitocondrial, que se encuentra en el espacio intermembranal en las células transformadas, pero no existe en tejidos normales. Ante un estímulo de muerte, la survivina se libera al citosol, e inhibe la activación de las caspasas 9 y 3, inhibiendo la apoptosis y permitiendo la progresión del tumor (Dohi *et al.*, 2004).

La isoforma generada por la pérdida del exón 3, **survivina delta exón 3 (survivina DEx3)**, sufre un cambio en el marco de lectura, lo cual resulta en un dominio BIR trunco, y una región carboxilo terminal única. A pesar de no tener el dominio BIR completo, esta isoforma retiene la función antiapoptótica similar a la de la survivina tipo, y se sobre expresada en tejido tumoral (Mahotka *et al.*, 1999). Esta isoforma posee una nueva señal de localización nucleolar, por lo cual se encuentra en el nucleolo, donde es degradada rápidamente por la vía del proteosoma, debido a la presencia de una señal de degradación. Ambas secuencias son necesarias para que la survivina DEx3 retenga su capacidad antiapoptótica (Song y Wu, 2005). La survivina DEx3 posee además una secuencia de localización mitocondrial y un dominio BH2 (Altieri, 2003). Interesantemente, se ha descrito un homólogo viral de la Survivina DEx3 que se localiza en la mitocondria y que inhibe la apoptosis por medio de su asociación con Bcl-2 y la supresión de la activación de la caspasa 3, en una forma dependiente de su dominio BIR (Wang *et al.*, 2002). Se ha observado que la survivina tipo puede formar heterodímeros con survivina DEx3, y que estos complejos se localizan en la mitocondria, donde podrían de una manera sinérgica inhibir la apoptosis mitocondrial (Caldas *et al.*, 2005). La survivina DEx3, a diferencia de la survivina tipo, no se une a los centrómeros ni a los microtúbulos de la zona media del huso mitótico (Mahotka *et al.*, 2002). Además, no interactúa con las proteínas pasajeras

cromosomales *in vivo*, y se ha sugerido que no interfiere en las actividades de la survivina tipo en la mitosis (Noton *et al.*, 2006).

Otra isoforma generada por la retención de parte del intrón 2 como un exón críptico es la **survivina 2B**. En esta isoforma el dominio BIR está interrumpido por la introducción del exón 2B, pero el marco de lectura no sufre cambios y conserva la región carboxilo terminal. Esta isoforma, a diferencia de las anteriores, pierde la capacidad antiapoptótica (Mahotka *et al.*, 1999). La survivina 2B se localiza en el citosol, y también puede formar heterodímeros con la survivina tipo (Caldas *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la survivina 2B inhibe la actividad de la survivina tipo cuando forman el complejo. Esta isoforma tampoco se une a los centrómeros ni a los microtúbulos de la zona media del huso (Mahotka *et al.*, 2002), y al igual que la survivina DEx3, no interactúa con las proteínas pasajeras cromosomales y tampoco tiene un papel en la mitosis (Noton *et al.*, 2006).

La isoforma **survivina 3B** posee un nuevo exón (3B) derivado de una porción del intrón 3. Esto resulta en la adquisición de un nuevo codón de paro dentro del exón 3B, por lo que es una proteína trunca, carente de la región carboxilo terminal, lo cual sugiere que no podría participar en el ciclo celular. Sin embargo, posee el dominio BIR intacto, por lo que podría retener la capacidad antiapoptótica (Badran *et al.*, 2004).

Por último, la isoforma **survivina 2 $\alpha$** , consiste de dos exones, el exón 1 y el exón 2, y una porción del intrón 2 como parte de la región 3'. También adquiere un nuevo codón de paro, que resulta en una proteína trunca (8.5 kDa), con un dominio BIR cortado y una carencia de la región carboxilo terminal. Debido a lo anterior, esta isoforma no retiene la capacidad antiapoptótica y no participa en la mitosis. Esta isoforma se localiza en el núcleo y en el citoplasma. Al igual que la survivina tipo, survivina 2 $\alpha$  se expresa en niveles elevados en células transformadas, en comparación con las no transformadas. Se ha visto que también puede interactuar con la survivina tipo, y se ha sugerido que podría atenuar su actividad antiapoptótica (Caldas *et al.*, 2005).

Debido a lo anterior, las diversas funciones de la survivina podrían ser explicadas, en parte, por la interacción con sus diferentes isoformas.

## **SMAC/DIABLO**

Durante el proceso apoptótico es necesario eliminar la inhibición de las caspasas mediada por las IAPs. Esta función la realiza la proteína Smac (Du *et al.*, 2000) en humanos, y DIABLO (Verhagen *et al.*, 2000) en ratones. El ARN mensajero de smac se encuentra expresado a niveles muy altos en testículo adulto, y en niveles altos en corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario, y una expresión baja en cerebro, pulmón, timo y leucocitos de sangre periférica (Du *et al.*, 2000).

Smac tiene una importante actividad antitumoral. Durante la apoptosis, la sobre expresión de Smac sensibiliza a las células a la muerte (Du *et al.*, 2000), pero en células que no están bajo un estímulo apoptótico Smac inhibe el crecimiento clonogénico al bloquear la migración aleatoria, incrementar la apoptosis e inhibir la proliferación, en una forma dependiente de la densidad y el tipo celular (Vogler *et al.*, 2005). Sin embargo, su función precisa en la apoptosis aún no es clara, ya que ratones deficientes de Smac son completamente viables y no presentan anormalidades. Todas las células cultivadas a partir de los ratones deficientes de Smac responden normalmente a estímulos apoptóticos, lo cual sugiere que otras proteínas pueden inhibir a las IAPs (Okada *et al.*, 2002).

### **Expresión en cáncer.**

Se ha observado que los niveles de expresión de Smac varían dependiendo del tipo de tumor, además de que hay cánceres que no lo expresan, lo que sugiere que la falta de expresión de Smac podría inhibir la apoptosis, promoviendo la supervivencia de las células tumorales (Yoo *et al.*, 2003).

En el cáncer cérvicouterino se ha observado una expresión *de novo* del ARNm de Smac, y que la expresión de la proteína se ha asociado a una alta recurrencia local de células escamosas (Espinosa *et al.*, 2004; Arellano-Llamas *et al.*, 2006). En cáncer de pulmón y carcinoma renal, la disminución en la expresión de Smac, se asocia a una progresión de la enfermedad y a un mal pronóstico (Sekimura *et al.*, 2004; Mizutani *et al.*, 2005).

### **Liberación mitocondrial de Smac.**

Smac se sintetiza como una proteína precursora de 239 aminoácidos, con una pre-secuencia de localización mitocondrial en el amino terminal, secuencia que es cortada por el complejo peptidasa de la membrana interna mitocondrial (IMP) para generar la proteína madura (Du *et al.*, 2000; Burri *et al.*, 2005). El gen smac es nuclear y consta de siete exones. La pre-secuencia de 55 aminoácidos está codificada por los exones 1 y 3 (Roberts *et al.*, 2001). Solo la forma madura de la proteína posee la actividad promotora de apoptosis. Smac se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria y se libera al citosol durante el proceso apoptótico (Du *et al.*, 2000). Smac forma homodímeros, y este arreglo es importante para su función proapoptótica (Chai *et al.*, 2000).

Smac maduro se libera al citosol en respuesta a diversos agentes apoptóticos, como radiación UV, radiación gamma, drogas citotóxicas, agentes que dañan al ADN y ligación de los receptores de muerte. Sin embargo, el mecanismo por el cual Smac se libera de la mitocondria no se conoce con exactitud. Además, existen dudas de si Smac y citocromo c se liberan por la misma vía debido a que, mientras que el citocromo c pesa 15 kDa, Smac se comporta como una proteína multimérica de 100 kDa (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Adrain *et al.*, 2001).

Existen reportes de que Smac y citocromo c se liberan de la mitocondria con cinéticas similares, lo que sugiere que lo hacen por el mismo mecanismo (Du *et al.*, 2000; Gorka *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). También se ha demostrado que la salida de ambas proteínas es regulada negativamente por Bcl-2 (Adrain *et al.*,



2001), y positivamente por JNK que después de su activación se mueve a la mitocondria y permite la salida de citocromo c y Smac (Chauhan *et al.*, 2003). Se ha observado también que la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por estímulos apoptóticos dependientes de Bax, Bid truncado o Bax/Bak, conduce a la liberación simultánea de citocromo c, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. Para la subsecuente activación de caspasas se requiere la salida de Endonucleasa G y AIF (Arnoult *et al.*, 2003).

Sin embargo, también se ha reportado lo contrario, que Smac y citocromo c salen de la mitocondria con cinéticas distintas; el tiempo para la liberación mitocondrial de Smac es cuatro veces mayor que para citocromo c (Springs *et al.*, 2002). También se ha visto que la salida de Smac al citosol requiere de caspasas activas, mientras que la de citocromo c no (Adrain *et al.*, 2001). Recientemente se demostró que la liberación de Smac de la mitocondria requiere de la presencia de citocromo c, así como de su previa liberación mitocondrial, ya que células citocromo c<sup>-/-</sup>, no pudieron liberar a Smac de la mitocondria durante la apoptosis, a pesar de la movilización de Bax a la mitocondria. Esto sugiere que se requiere que el citocromo c active un mecanismo para liberar a Smac (Hansen *et al.*, 2006). Por otra parte, la salida de Smac de la mitocondria es regulada por la cinasa treonina-serina MEKK1, mientras que la de citocromo c no (Mendoza *et al.*, 2005).

La regulación de la salida de citocromo c y Smac también es diferente en la vía de los receptores de muerte. TRAIL pudo inducir la liberación de citocromo c en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) Bid<sup>-/-</sup>, Bax<sup>-/-</sup> y Bak<sup>-/-</sup>, pero no en los Bax<sup>-/-</sup>Bak<sup>-/-</sup>. Sin embargo, el tratamiento con TRAIL no pudo inducir la salida de Smac al citosol en los MEFs Bid<sup>-/-</sup>, Bax<sup>-/-</sup>, Bak<sup>-/-</sup>, o Bax<sup>-/-</sup> Bak<sup>-/-</sup>, por lo que se sugiere que la liberación de Smac no depende de Bid. Bid induce la oligomerización de Bax y Bak en la mitocondria, proteínas que son requeridas para la liberación de Smac (Kandasamy *et al.*, 2003).

Sin embargo, también se ha sugerido que las diferencias observadas en la liberación de las proteínas de la mitocondria se deben a los diferentes

amortiguadores utilizados. La disociación de citocromo c de la mitocondria es dependiente de la fuerza iónica del buffer, mientras que la de Smac/DIABLO no (Uren *et al.*, 2005).

### **Isoformas de Smac.**

Una búsqueda en la base de datos del GenBank identificó cuatro posibles isoformas de Smac (Roberts *et al.*, 2001), pero solo se han clonado y analizado tres de estas, incluyendo a la isoforma Smac alfa (Figura 4). La isoforma Smac S/Smac beta posee un nuevo amino terminal codificado por el exón 2, carece de la secuencia de localización mitocondrial y del tetrapéptido de unión a las IAPs. Se expresa en varias líneas celulares y su nivel de expresión es similar al de Smac. Esta isoforma es citosólica y su distribución no cambia durante la apoptosis. Se ha demostrado que no interactúa *in vivo* con XIAP, cIAP-1 y cIAP-2. Sin embargo, Smac beta es capaz de potenciar la apoptosis inducida por estímulos que actúan por las vías extrínseca e intrínseca. Lo anterior ha sugerido que la principal función de esta isoforma de Smac reside en su región carboxilo terminal y no involucra la interacción con las IAPs (Srinivasula *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2001).

Por su parte Smac 3 posee una secuencia de localización mitocondrial y conserva el tetrapéptido indispensable para la unión a XIAP, pero carece del exón 4. Se encuentra expresado en varios tejidos humanos y líneas celulares. Esta isoforma se localiza en la mitocondria y es liberada al citosol durante la apoptosis, donde interactúa con XIAP para eliminar el efecto inhibitorio sobre la caspasa 9 y permitir la activación de la caspasa 3, potenciando así la apoptosis. Además participa en la regulación de la estabilidad de XIAP, ya que promueve su autoubiquitinación y degradación, efecto dependiente de la asociación física de ambas proteínas (Fu *et al.*, 2003).

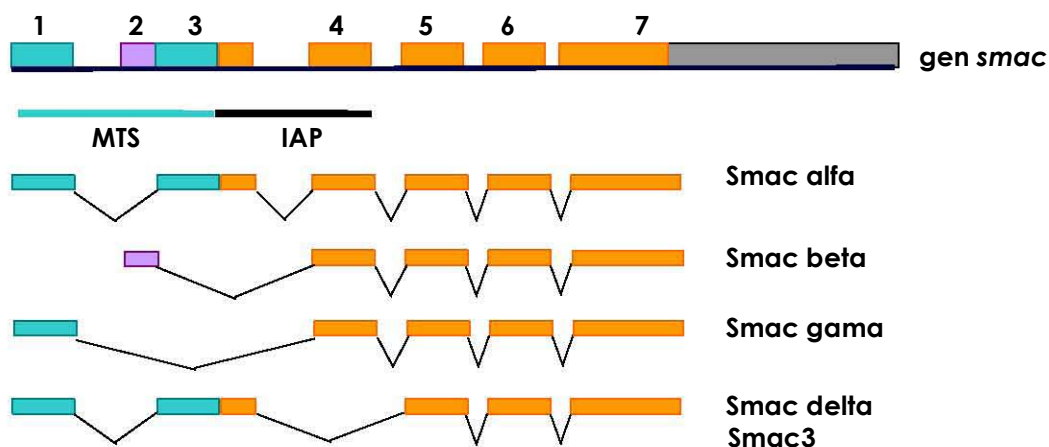


Figura 4. Isoformas de Smac. Estructura del gen smac; los exones se muestran numerados. La sección gris representa la región no codificante. En verde se muestra la secuencia de localización mitocondrial (MTS) y la línea negra representa el dominio de unión para las IAPs. (Tomada de Roberts *et al.*, 2001).

### Mecanismo de interacción con las IAPs.

Smac estimula la activación de caspasas por medio de la unión e inhibición de las IAPs, y de esta manera potencia la apoptosis (Du *et al.*, 2000). De las IAPs analizadas, Smac es capaz de unirse a XIAP, cIAP-1, cIAP-2, Survivina (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), ML-IAP (Vucic *et al.*, 2002), BRUCE (Hao *et al.*, 2004), pero no a NAIP (Davoodi *et al.*, 2004). Smac puede unirse sólo a una forma estabilizada de ILP-2, a la cual se agregaron 9 residuos, ya que normalmente es una proteína muy inestable (Shin *et al.*, 2005). La interacción entre Smac y las diferentes IAPs es dependiente de sus dominios BIR.

Smac puede interactuar con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP, pero no con el BIR1. Para esta interacción es indispensable el nuevo amino terminal expuesto después de su transporte a la mitocondria, específicamente los primeros cuatro residuos, el tetrapéptido alanina-valina-prolina-isoleucina (AVPI) (Figura 5A). De los cuatro residuos del tetrapéptido, la alanina es la que contribuye de manera más importante para el reconocimiento específico de XIAP, mientras que los otros tres

residuos hacen interacciones importantes con la superficie del BIR3 y ayudan al posicionamiento de la alanina (Wu *et al.*, 2000). Mutaciones en cualquiera de estos cuatro aminoácidos comprometen la interacción de Smac con XIAP (Chai *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). Debido a que los residuos importantes en el BIR3 para la unión de Smac, están conservados en el BIR2, se propone que Smac interactúa con este dominio de manera similar (Figura 5B). También se sugiere que Smac interactúa con las otras IAPs de la misma manera como lo hace con XIAP, debido a lo conservado de sus dominios BIR (Liu *et al.*, 2000).

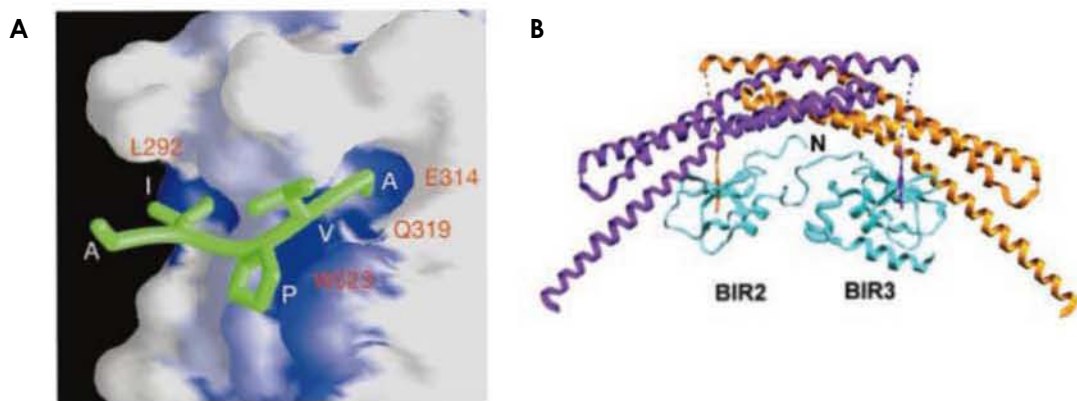


Figura 5. Interacción Smac-IAP. A) Interacción del amino terminal de Smac con el surco hidrofóbico del BIR3 de XIAP. El tetrapéptido de Smac se muestra en verde. B) Modelo de la interacción del dímero de Smac con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP. Los monómeros de Smac se muestran en morado y naranja, respectivamente. (Tomada de Wu *et al.*, 2000 y Huang *et al.*, 2003).

### Efecto de la interacción de Smac con las IAPs.

Los niveles de Smac se ha demostrado pueden ser regulados como consecuencia de su interacción con las IAPs. Varios estudios demuestran que XIAP promueve la ubiquitinación de Smac a través de su actividad de ligasa de ubiquitina (E3), lo que resulta en su degradación (MacFarlane *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2004). Además, cIAP-1 y cIAP-2 promueven la ubiquitinación y degradación de Smac *in vitro* e *in vivo* (Hu y Yang, 2003; Yang y Du, 2004). Recientemente se reportó que el BIR3 de cIAP-1 es necesario para la unión y ubiquitinación de Smac (Samuel *et al.*, 2006). También BRUCE induce la

ubiquitinación y degradación de Smac maduro, pero a diferencia de las otras IAPs, puede unir y degradar además a su precursor (Hao *et al.*, 2004; Qiu y Goldberg, 2005). ML-IAP puede también inducir la degradación de Smac a través de su actividad de ligasa de ubiquitina E3 (Ma *et al.*, 2006). Es posible que tanto Smac como la IAP sean degradadas al mismo tiempo (Vaux y Silke, 2005).

Smac, además de ser un antagonista de las IAPs, puede promover la autoubiquitinación y degradación de las mismas IAPs. Un estudio ha demostrado que Smac estimula la degradación de cIAP-1 y cIAP-2, pero no de XIAP y ML-IAP, aunque promueve la autoubiquitinación de las cuatro IAPs (Yang y Du, 2004). Por su parte, una de las isoformas de Smac, Smac 3, promueve la autoubiquitinación y degradación de XIAP (Fu *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha demostrado una degradación de XIAP inducida por Smac (Fu *et al.*, 2003; Silke *et al.*, 2004). En otro estudio se ha reportado que Smac interactúa con XIAP y Survivina, pero sólo promueve la autoubiquitinación y degradación de Survivina (McNeish *et al.*, 2005). Cabe recordar que Survivina carece del dominio RING y que por lo tanto no presenta actividad de ligasa de ubiquitina (E3).

De manera interesante se ha reportado que Smac, más que degradar selectivamente a las IAPs, podría suprimir globalmente la expresión de proteínas a una baja densidad celular. Smac disminuye la expresión de las proteínas XIAP y Survivina, así como FLIP, caspasa 2 y p21, mientras que la expresión de sus ARNs mensajeros no sufren cambios (Vogler *et al.*, 2005).

Esta interacción de Smac con las IAPs afecta el umbral apoptótico. En la apoptosis inducida por receptores de muerte, la interacción de XIAP con Smac es más importante que la interacción de XIAP con las caspasas para inhibir la muerte (Zhang *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002). Adicionalmente, en células que expresan una mutante de XIAP que es incapaz de unirse a las caspasas 9 y 3, pero que retiene la habilidad de unirse a Smac, XIAP aún es capaz de inhibir la apoptosis inducida por radiación UV y etopósido. Sin embargo, cuando XIAP pierde la capacidad de unirse a Smac ya no puede inhibir la apoptosis (Silke *et al.*, 2002).

Adicionalmente, existen miembros de la familia IAP que tienen una menor afinidad hacia las caspasas en comparación con XIAP, pero que aún pueden inhibir el proceso apoptótico. Tal es el caso de ML-IAP, que inhibe débilmente a la caspasa 9, pero posee una mayor afinidad por Smac, similar a la de XIAP (Vucic *et al.*, 2005). De igual manera a ML-IAP, ILP-2 es un débil inhibidor de caspasa 9 y es una molécula muy inestable, sin embargo, una forma estabilizada de ILP-2 tuvo una fuerte asociación con Smac (Shin *et al.*, 2005). Incluso la IAP baculoviral Op-IAP puede inhibir la apoptosis dependiente de Bax en células de mamíferos. Y aunque no puede inhibir a las caspasas, es capaz de unirse a Smac y promover su ubiquitinación. Su función inhibidora de apoptosis es dependiente de su unión a Smac (Wilkinson *et al.*, 2004). También se ha reportado que la Survivina puede inhibir la apoptosis a través de su interacción con Smac. En este estudio la Survivina no fue capaz de inhibir a las caspasas. Además, para la actividad antiapoptótica de la Survivina, se requiere la presencia de XIAP, que al ya no ser inhibida por Smac es capaz de inhibir a las caspasas (Song *et al.*, 2003). Por lo tanto, se ha sugerido que el balance entre las actividades de las IAPs y las de Smac regulan el proceso apoptótico (Duckett, 2005).

### **III. HIPÓTESIS**

Durante la apoptosis mitocondrial Smac es regulado diferencialmente dependiendo del estímulo apoptótico y las IAPs están involucradas en el mecanismo de regulación.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **GENERAL.**

Analizar los niveles de regulación de Smac durante la apoptosis intrínseca y estudiar la posible participación de las IAPs.

#### **ESPECÍFICOS.**

1. Establecer cuatro modelos apoptóticos de la vía intrínseca en células HeLa con diferentes blancos celulares.
2. Analizar la liberación de Smac, así como los niveles de proteína y ARN mensajero de Smac durante la apoptosis mitocondrial.
3. Investigar los mecanismos por los cuales se está regulando Smac durante el proceso apoptótico.
4. Analizar la participación de las IAPs en la regulación de Smac durante la apoptosis intrínseca.

## **V. METODOLOGÍA**

### **Línea celular**

HeLa. Línea celular derivada de cáncer epitelial de cérvix (ATCC CCL-2).

### **Cultivo Celular**

Se mantuvieron las células en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Determinación de la dosis letal media (LD50)**

Para determinar la dosis letal media de taxol, estaurosporina, etopósido y ausencia de suero en las células HeLa, se sembraron las células en placas de 24 pozos a una densidad de 50,000 células por pozo. Se trataron las células con concentraciones crecientes de los tres agentes por 12, 24, 36 y 48 horas. En el caso de la ausencia de suero, las células fueron sembradas en medio con 5% de suero, al día siguiente se lavaron con PBS y se les añadió medio libre de suero. Se incubaron las células hasta por 8 días. Posteriormente se evaluó la viabilidad de las células con la técnica de cristal violeta.

### **Viabilidad celular. Cristal Violeta**

Se lavaron las células con PBS y se fijaron con etanol al 70%. Se tiñeron con el cristal violeta (0.1% en etanol al 70%) por 10 minutos y se enjuagaron con agua corriente. El cristal violeta se disolvió con ácido acético al 33% y se cuantificó en un lector de ELISA a 570 nm. Los datos fueron analizados y graficados como porcentajes de viabilidad celular.



### **Tinción con Bromuro de etidio**

Se fijaron las células con etanol al 70%, posteriormente se hidrataron con PBS y se incubaron con RNAsa. Se tiñeron con bromuro de etidio por 10 minutos y se lavaron con PBS. Las células fueron montadas sobre portaobjetos con PBS:glicerol y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

### **Extracción de proteínas totales**

El botón celular se obtuvo con PBS. Se decantó el botón celular y se resuspendió en el buffer RIPA (1% de NP40, 0.5% de Deoxicolato de sodio y 0.1% de SDS en PBS, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa) a una densidad de 12 millones de células/ml. Posteriormente las células resuspendidas fueron pasadas 20 veces por una jeringa de 1 ml para romper las membranas. Se incubaron en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron, en una centrífuga refrigerada, a 10,000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante fue recuperado como proteína total.

### **Extracción de proteínas citosólicas y mitocondriales**

Se obtuvo el botón celular con PBS. Se resuspendió en buffer de lisis (250 mM de sacarosa, 70 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 4.3 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7.2, 100 mM de PMSF, 200 mg/ml de digitonina, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa) a una densidad de 30 millones de células/ml. Se incubaron las células en hielo por 5 minutos y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante obtenido fue recuperado como la fracción citosólica. El botón se resuspendió en el doble de volumen utilizado para el buffer de lisis, en buffer de lisis mitocondrial (50 mM de Tris a pH 7.4, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2 mM

de EGTA, 0.2% de Tritón X-100, 0.3% de NP40, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas). Se incubaron las células por 5 minutos en hielo y se centrifugaron por 15 minutos a 10,000 rpm en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se guardó como la fracción mitocondrial.

### **Western blot**

Se prepararon geles de acrilamida al 15% y fueron cargados con las cantidades estandarizadas de proteínas, se realizó la electroforesis para permitir la separación de las proteínas. Los geles fueron transferidos a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-Tween (0.1%) por una hora, y se incubaron por una noche con el anticuerpo primario. Las membranas se lavaron con TBS-Tween y se les aplicó el anticuerpo secundario por una hora. El anticuerpo secundario se lavó y la señal fue desarrollada con el kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos utilizados fueron: Caspasa 9 cortada (Asp330), Caspasa 9, Caspasa 3 cortada y Caspasa 7 cortada de la marca Cell Signaling; Smac y PARP de Oncogene; Citocromo c , c-IAP-1 y hILP/XIAP de BD Biosciences; Anti-mitocondria de Chemicon International; Survivina , Caspasa 8, Caspasa 9, Caspasa 3, Smac y Nucleolina de Santa Cruz Biotechnologies, Inc.; Bax y Bcl-2 de DAKO; Survivina DEx3 de abcam; Anti-ratón IgG (H + L) conjugado a HRP y Anti-conejo IgG (H + L) conjugado a HRP de Promega; el anticuerpo contra Actina fue proporcionado amablemente por el Dr. Herrera (IPN).

### **Extracción de ARN total**

Para extraer el ARN total de las células se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron homogeneizadas con trizol, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase

acuosa se precipitó con isopropanol. Su pureza se verificó con la relación 260/280, y su integridad en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **Síntesis de ADN complementario (RT)**

La síntesis se hizo a partir de 1 µg de ARN total usando hexámeros al azar, y la enzima transcriptasa reversa termoestable de la siguiente manera: 1 µg de ARN total se desnaturalizó a 65°C durante 5 min, se agregaron hexámeros sintetizados al azar, deoxinucleótidos y enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. Se incubó por 50 min a 50°C, la reacción se paró a 85°C y se incubó durante 20 min. a 37°C con RNAsa H. La expresión del ARN mensajero se normalizó con la expresión de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizó el análisis densitométrico para obtener unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron de acuerdo a la intensidad de la expresión de GAPDH.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El ADN complementario (ADNc) sirve como templado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los componentes de la PCR, además del ADNc, incluyen deoxinucleótidos (dNTPs), buffer, enzima polimerasa ADN termoestable y primers específicos para el gen de interés. El ADNc es amplificado exponencialmente por medio de ciclos de desnaturalización, alineación y extensión.

Las condiciones para este ensayo son: 2.5 unidades de la polimerasa Amplitaq, 2 mM de deoxinucleótidos, 10 pM de primers y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

En la amplificación del ADNc de los diferentes genes se utilizaron oligos específicos para cada uno, así como ciclos y temperaturas;

### **GAPDH.**

Oligos: sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3',

antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 95 °C 30 seg., 60 °C 30 seg., 72 °C 30 seg. (25 ciclos).

### **Smac alfa.**

Oligos: sentido 5' GCGCGGATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT 3'

antisentido 5' AGCTCTCTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 95 °C 30 seg., 72 °C 2 min. (3 ciclos); 95 °C 30 seg., 68 °C 30 seg., 72 °C 1 min. (30 ciclos) y 72 °C 5 min. (1 ciclo).

### **Smac beta.**

Oligos: sentido 5' TGTTACCGCGGGGCGGTCGTGCCTTATGAAATCTG 3'

antisentido 5' GTGTGTCTAGACCCTCAATCCTCACGCAGGTAGG 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 95 °C 30 seg., 72 °C 2 min. (3 ciclos); 95 °C 30 seg., 70 °C 2 min. (3 ciclos); 95 °C 30 seg., 68 °C 2 min. (40 ciclos) y 72 °C 5 min. (1 ciclo).

### **XIAP.**

Oligos: sentido 5' GCACGAGCAGGGTTTCTTATACTGGTG 3'

antisentido 5' CTCTTCACAATACATGGCAGGGTTCCTC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 95 °C 30 seg., 72 °C 1 min. (3 ciclos); 95 °C 30 seg., 68 °C 30 seg. (40 ciclos) y 72 °C 5 min. (1 ciclo).

### **clAP-1.**

Oligos: sentido 5' GAATACTCCCTGTGATTAATGGTGCCGTGG 3'

antisentido 5' TCTCTTGCTTGTAAGACGTCTGTGTCTTC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 70 °C 3 min. (3 ciclos); 94 °C 30 seg., 68 °C 3 min. (3 ciclos); 94 °C 30 seg., 65 °C 30 seg., 72 °C 1 min. (35 ciclos).

### **Survivina.**

Oligos: sentido 5' GCCATGAATTCATGGGTGCCCCGACGTTGC 3'

antisentido 5' AGCTCTCTAGAGAGGCCTCAATCCATGGCA 3'.

Condiciones: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 30 seg., 72°C 2 min. (3 ciclos); 95°C 30 seg., 68°C 30 seg., 72 °C 1 min. (35 ciclos) y 72°C 5 min. (1 ciclo)

Los productos son obtenidos en la fase logarítmica de la reacción de la PCR, para lo cual se obtuvieron alícuotas a diferentes ciclos y se analizaron para asegurar que no estuvieran saturados (curva de saturación). Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y la intensidad de la banda se cuantificó por densitometría.

### **Análisis densitométrico**

Se utilizó un programa de densitometría (Scion Image) para obtener unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron de acuerdo a su control respectivo. En el caso del Western blot se utilizó la expresión de actina, una proteína mitocondrial o nucleolina como control de carga. Para el RT-PCR se utilizó la expresión de GAPDH.

### **Clonación de las isoformas de Smac**

El ADNc de las células expuestas a cisplatino por 8 horas se utilizó como templado para el PCR de Smac beta. El producto de la amplificación se clonó directamente en el vector PCR2.1TOPO (Invitrogen). A partir de este plásmido se obtuvo la secuencia de *Smac fi* que se subclonó en el vector viral pLXSN (Invitrogen) y en el vector pHM6 (Roche), para marcar con una bandera de seis histidinas a la proteína. La secuencia de *Smac epsilon* se obtuvo a partir del PCR de Smac alfa. El producto de PCR se clonó directamente en el vector pTRE (Clontech). Posteriormente se subclonó en los vectores pLXSN y pHM6.

### **Inhibición de p34cdc2**

Las células fueron incubadas con olomoucina (Promega) a una concentración de 100  $\mu$ M por 1 hora. Después de este tiempo se expusieron a la LD50 de etopósido (100  $\mu$ M) por 14 horas más. Los controles con olomoucina y vehículo se cultivaron por el mismo tiempo. Se extrajeron proteínas totales y se analizaron por Western blot.

### **Inhibición del proteosoma con MG132**

Las células fueron expuestas a la LD50 de estaurosporina (250 nM) más MG132 (Calbiochem) por 8 horas (tiempos de exposición más largos fueron tóxicos). Los controles expuestos al MG132 y al vehículo se cultivaron por el mismo tiempo. Se extrajeron proteínas totales y se analizaron por Western blot.

### **Clonación de la secuencia de Bcl-2 en antisentido**

El marco de lectura abierto de Bcl-2 se obtuvo a partir del plásmido BK-KS-Bcl2, amablemente proporcionado por el Dr. Stanley Korsmeyer. La secuencia fue clonada en la orientación antisentido en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). La construcción fue transfectada de manera estable en células HeLa. La inhibición de la expresión de Bcl-2 se verificó por Western blot.

### **Transfección estable**

Las células HeLa fueron transfectadas de manera estable con el lípido ESCORT (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ADN fue mezclado con el lípido en medio sin suero y aplicado a las células por 6 horas. Posteriormente se retiró el medio de transfección y se sustituyó por medio suplementado con 5% de suero fetal bovino. Al día siguiente se seleccionaron las células transfectadas con geneticina a una concentración de 800 µg/ml. La selección se realizó por 15 días.

### **Extracción de proteínas nucleares y citosólicas**

El botón celular se obtuvo con PBS. Se decantó el botón y se resuspendió en buffer A (100 mM de Hepes pH 7.5, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de EGTA, con inhibidores de proteasas y fosfatasa) a una densidad

de 6.6 millones de células/ml. Se incubaron las células por 15 minutos en hielo. Posteriormente se agregaron 15  $\mu$ l de NP40 (Nonidet P-40) al 10%, e inmediatamente se centrifugaron a 5000 rpm por 15 minutos en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante se recuperó como la fracción citosólica. El botón celular se resuspendió en buffer C (25 mM de Hepes pH 7.5, 400 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, con inhibidores de proteasas y fosfatasa), en la tercera parte del volumen ocupado de buffer A. Se incubó en hielo por 30 minutos mezclando ocasionalmente. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, y el sobrenadante se guardó como la fracción nuclear.

### **ARN de interferencia para Survivina y Survivina DEx3**

Los ARN de interferencia para la Survivina y Survivina DEx3 fueron diseñados en el laboratorio (Espinosa M, manuscrito en preparación). Las construcciones fueron clonadas en el vector pGEM-T Easy (Promega) bajo el control del promotor de U6 de humano. Se evaluó la efectividad de las construcciones por RT-PCR y Western blot. Los ARN de interferencia se transfectaron transitoriamente en las células HeLa. Al día siguiente de la transfección se expusieron a la LD50 del etopósido por 48 horas. Se extrajeron proteínas citosólicas, mitocondriales y totales, y se analizaron por Western blot. Adicionalmente se evaluó la viabilidad de las células expuestas al etopósido con la técnica de cristal violeta.

### **Transfección transitoria**

Se transfectaron las células HeLa con el lípido Lipofectamine 2000 (Invitrogen) o con Lipofectamine Plus (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con modificaciones ligeras. Se sembraron  $6 \times 10^4$  células en cajas de 48 pozos para el análisis de la viabilidad, y  $1.3 \times 10^5$  células en cajas de 35 mm de diámetro para la extracción de proteínas. Al día siguiente se transfectaron con el ADN, 0.2 ng de plásmido por pozo, y 1  $\mu$ g por caja de 35 mm. Se incubaron las células con



el lípido por 6 horas, posteriormente se retiró el medio de transfección y se sustituyó por medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%. 24 horas después de la transfección se aplicó el etopósido a la dosis letal media y posteriormente se fijaron con etanol para evaluar la viabilidad o se extrajeron proteínas totales, citosólicas y mitocondriales.

### **Sobre expresión de la Survivina**

El marco de lectura abierto (ORF) de la Survivina, obtenido por RT-PCR, fue clonado en el vector pTZ57R/T (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ORF de la Survivina fue subclonado en el vector pQCXIP (Clontech). Se transfectaron establemente células con esta construcción y con vector vacío como control. Las células se seleccionaron con puromicina por tres semanas. Se verificó la sobreexpresión de la Survivina por Western blot. Para los experimentos subsecuentes se utilizó un pool de las clonas. Para el análisis de la viabilidad se sembraron 60,000 células/pozo en caja de 48 pozos, se expusieron a la LD50 de estaurosporina por 24 h y se tiñeron con cristal violeta.

### **Análisis estadístico**

Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. La comparación estadística entre grupos experimentales y grupos control se realizó utilizando la prueba de Anova de dos vías (Bonferroni). Valores con  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## VI. RESULTADOS

### *Inducción de apoptosis en células HeLa.*

Para inducir la apoptosis en las células HeLa (cáncer cérvicouterino) se seleccionaron inicialmente cuatro estímulos que activaran la vía intrínseca: estaurosporina, etopósido, taxol y ausencia de suero (sus mecanismos de acción se explican en el Anexo 2). Se trataron las células a diferentes tiempos y concentraciones, y la viabilidad se analizó por medio de la técnica de cristal violeta. Como se observa en la Figura 6 la disminución de la viabilidad es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a las drogas. Para comparar resultados entre los diferentes estímulos se seleccionó la dosis letal media (LD50) de cada estímulo (Tabla I).

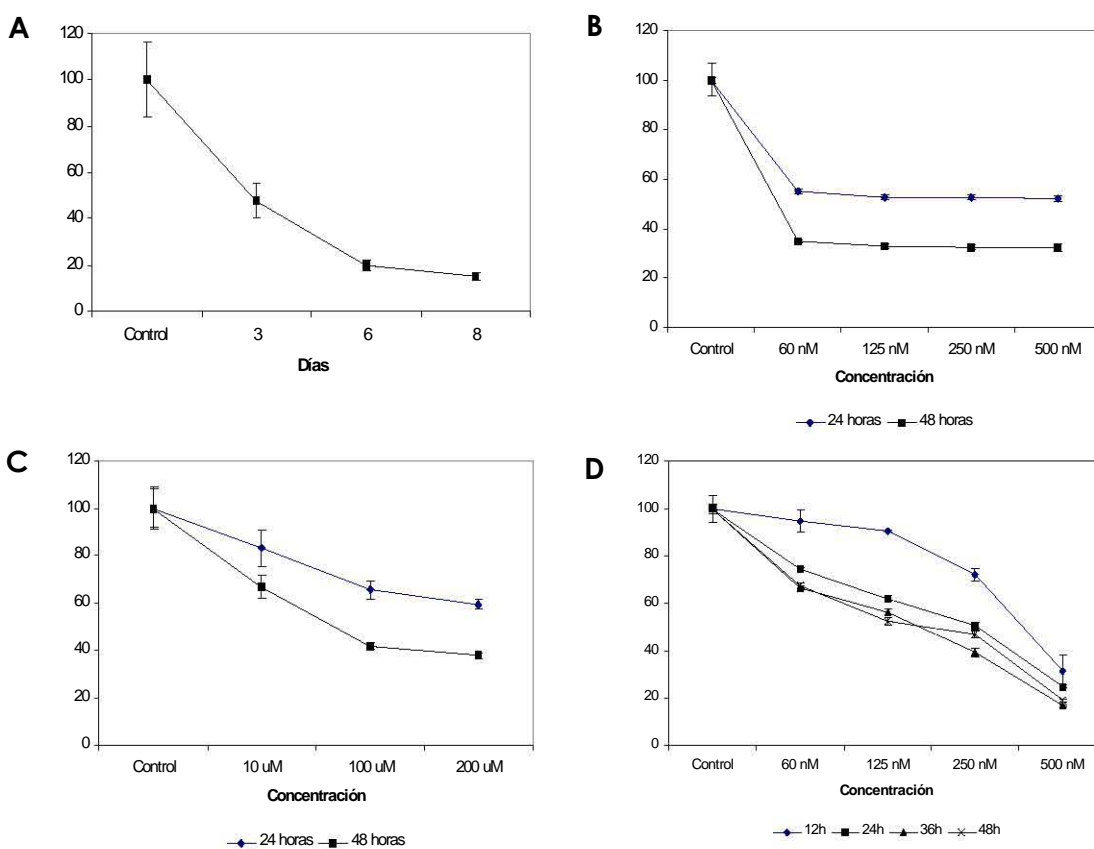


Figura 6. Curvas de viabilidad. Determinación de la dosis letal media de ausencia de suero (A), taxol (B), etopósido (C) y estaurosporina (D) en células HeLa. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada estímulo y se grafican los promedios con la desviación estándar.

Tabla I. Dosis letal media de los estímulos apoptóticos empleados.

Estímulo	Concentración	Tiempo
<b>Estaurosporina</b>	250 nM	24 h
<b>Etopósido</b>	100µM	48 h
<b>Taxol</b>	45 nM	48 h
<b>Ausencia de suero</b>	0%	72 h

Para asegurar que la disminución en la viabilidad causada por los estímulos se debiera a apoptosis se analizó la morfología nuclear de las células por medio de tinción con bromuro de etidio. Las células fueron tratadas con la LD50 de los estímulos, posteriormente fueron fijadas con etanol y teñidas con el bromuro de etidio. En las células tratadas con los cuatro estímulos se observa una clara condensación nuclear característica de la apoptosis (Figura 7).

Adicionalmente se analizaron otras características de la apoptosis como la activación de caspasas y el corte de PARP, un sustrato de las caspasas efectoras 3 y 7. Proteínas totales se extrajeron de las células expuestas a la LD50 de los estímulos y se analizaron por medio de Western blot. En la Figura 8A se muestra que las caspasas 9 y 3 se activaron con los cuatro estímulos, como se observa por la disminución de la forma precursora de la enzima, aunque la intensidad de la activación fue distinta entre los estímulos. La activación de la caspasa 9 fue más significativa con ausencia de suero y taxol, comparada con la activación en células tratadas con etopósido y estaurosporina.

La caspasa 3 se encontró activa con todos los estímulos, sin embargo, con etopósido los niveles de activación de esta caspasa fueron menores que con los otros estímulos. De igual forma el corte de PARP fue diferente en cada estímulo. Con el tratamiento de taxol y etopósido se encontraron las mayores concentraciones de PARP fragmentado, mientras que con estaurosporina y ausencia de suero la concentración del fragmento fue menor. La presencia del fragmento de PARP no correlacionó directamente con la activación de la caspasa 3.

En la Figura 8B se observa que las células expuestas al etopósido presentan una mayor activación de las caspasas 9 y 7, comparada con la activación presente en células expuestas a estaurosporina. La activación de las caspasas 8 y 3 fue mayor en células expuestas a estaurosporina que aquellas expuestas a etopósido. Estas diferencias sugirieron divergencias en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

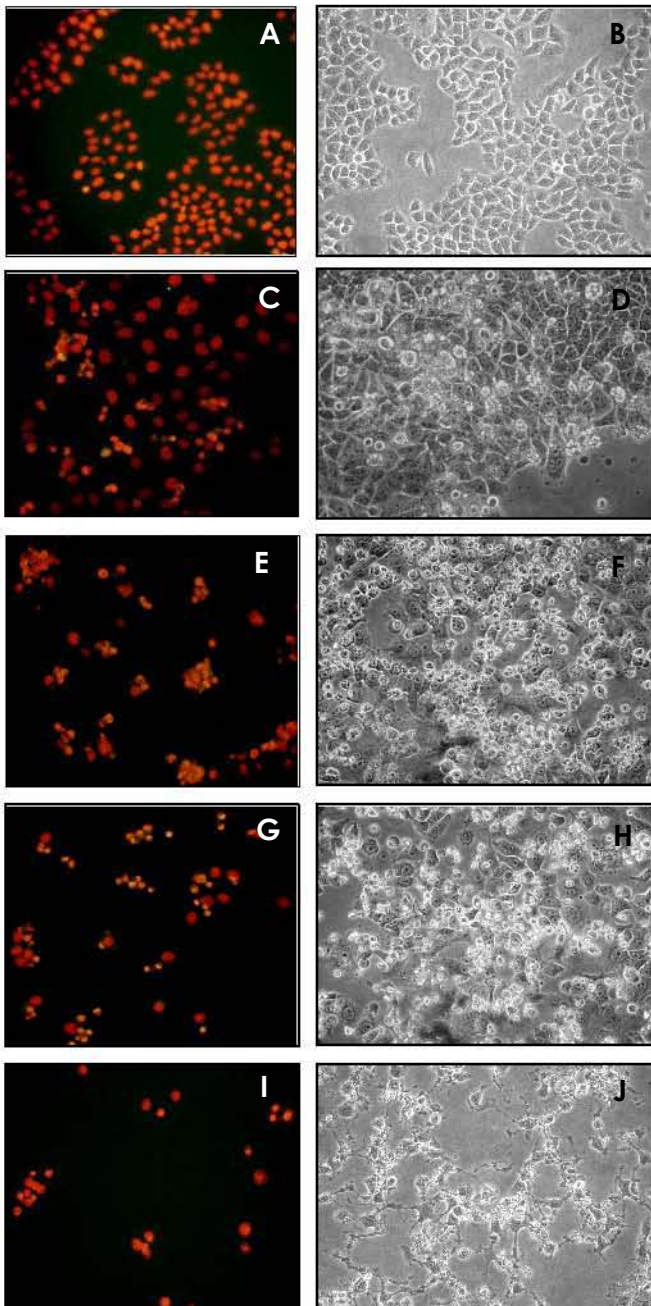


Figura 7. Morfología nuclear de las células HeLa expuestas a los diferentes estímulos apoptóticos. Control (A, B), en ausencia de suero (C, D), con taxol (E, F), etopósido (G, H) y estaurosporina (I, J). Se muestra la tinción con bromuro (A, C, E, G, I) y el contraste de fases (B, D, F, H, J).

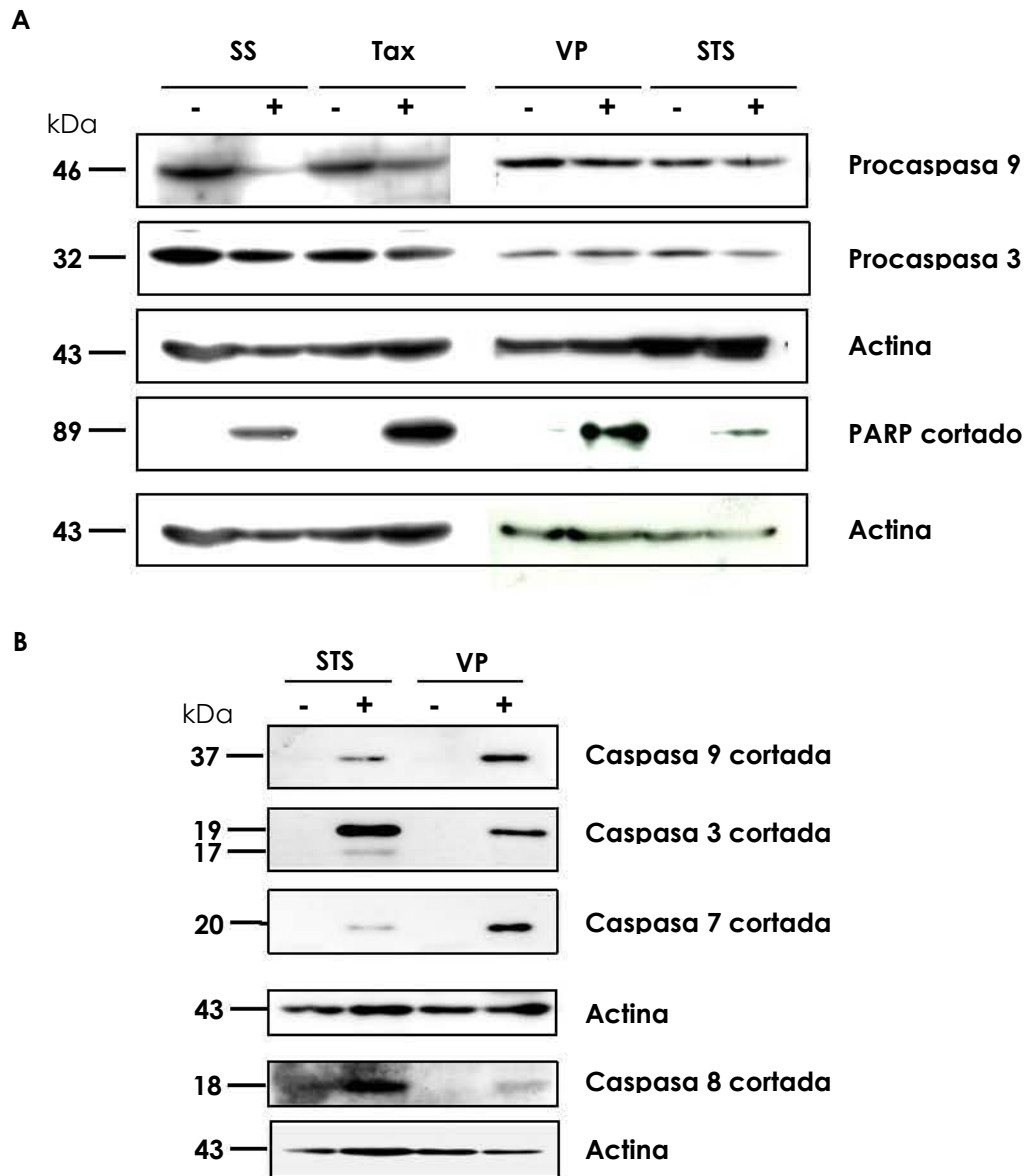


Figura 8. Activación de caspasas y corte de PARP durante la apoptosis. A) Western blot de proteínas totales extraídas a la LD50 de cada estímulo. Se utilizaron anticuerpos específicos para la forma precursora de las caspasas y el fragmento cortado de PARP. B) Western blot con proteínas citosólicas y anticuerpos contra la forma activa de las caspasas. La expresión de actina se utilizó como control de carga. Ausencia de suero, SS; taxol, Tax; etopósido, VP; estaurosporina, STS.

### **Liberación de citocromo c y Smac durante la apoptosis.**

La vía intrínseca de la apoptosis se caracteriza por la liberación de diversas proteínas mitocondriales al citosol. A continuación se analizó la liberación de citocromo c y de Smac. Proteínas citosólicas se extrajeron de las células expuestas a la LD50 de los agentes y se analizó por Western blot la presencia de estas proteínas. Como se muestra en la Figura 9, con los cuatro estímulos se observó la liberación de citocromo c al citosol; sin embargo, con el etopósido hubo una menor acumulación de esta proteína en el citosol comparada con los otros estímulos. Los niveles de Smac en el citosol de las células expuestas a estaurosporina fueron menores en comparación con las células expuestas a etopósido (Figura 9).

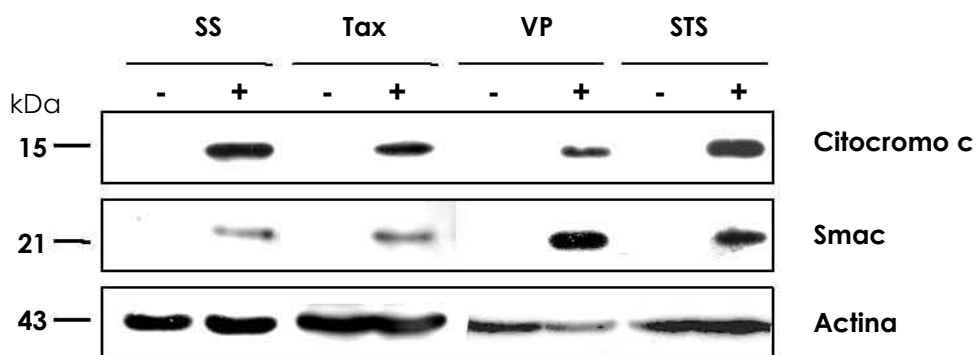


Figura 9. Liberación de citocromo c y Smac al citosol. Western blot de proteínas citosólicas de células expuestas a los agentes indicados. La expresión de actina se utilizó como control de carga. Ausencia de suero, SS; taxol, Tax; etopósido, VP; estaurosporina, STS.

### **Regulación de los niveles de Smac durante la apoptosis.**

Posteriormente se analizaron los niveles totales de Smac. Proteínas totales se extrajeron de las células expuestas a la LD50 de los estímulos y se analizaron por Western blot. En la Figura 10A se observa que durante la apoptosis inducida por taxol y ausencia de suero, los niveles de Smac disminuyeron aproximadamente en la misma proporción. De manera interesante, el tratamiento con etopósido no indujo cambios en los niveles de Smac, los cuales se mantuvieron constantes con

respecto al control. La exposición a estaurosporina indujo también la disminución de los niveles de Smac.

Para eliminar la posibilidad de que los cambios observados en los niveles de Smac se debieran a un mecanismo de regulación transcripcional, se analizaron por RT-PCR los niveles de sus dos principales isoformas, Smac alfa y Smac beta. El ARN se extrajo de las células expuestas a los estímulos apoptóticos y se obtuvo el ADN complementario utilizado para el PCR. En la Figura 10B se observa que hubo una modulación de los niveles de ambas isoformas dependiente del estímulo apoptótico. La isoforma Smac alfa mostró un incremento en sus niveles durante la apoptosis inducida por ausencia de suero (3.7 veces) y por taxol (1.8 veces); con estaurosporina y etopósido los cambios fueron menores (1.09 y 0.8 veces, respectivamente). Respecto a la isoforma Smac beta, sus niveles se incrementaron con la ausencia de suero (2.1 veces), taxol (1.5 veces) y estaurosporina (1.3 veces), mientras que con etopósido se mantuvieron constantes.

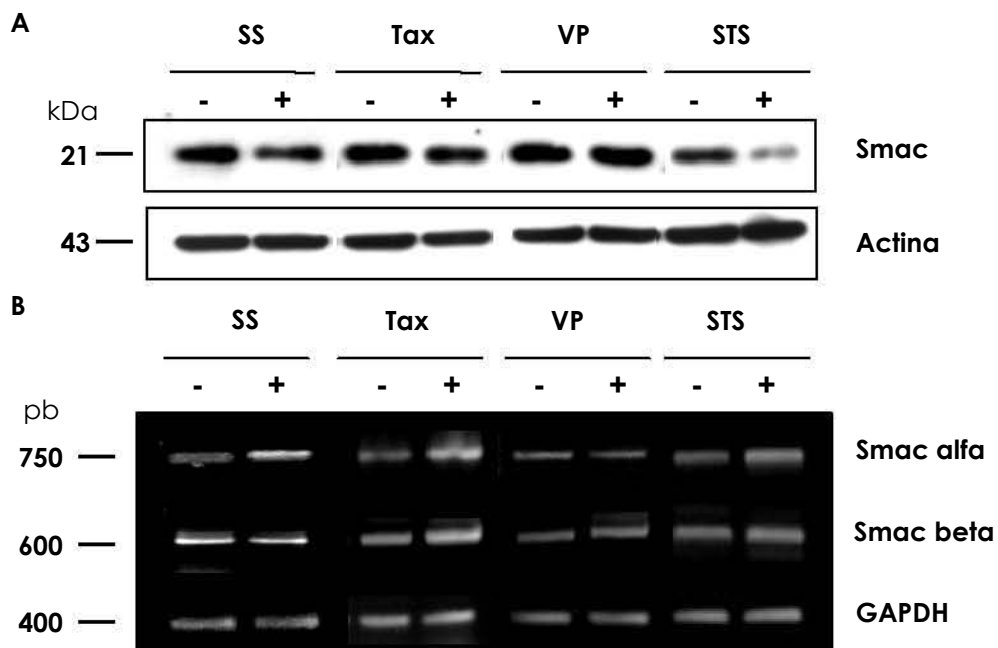


Figura 10. Modulación de los niveles de proteína y ARNm de Smac durante la apoptosis. A) Western blot de Smac en proteínas totales de células expuestas a los diferentes estímulos. La expresión de actina se utilizó como control de carga. B) RT-PCR del ARNm de Smac alfa y Smac beta, la expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Ausencia de suero, SS; taxol, Tax; etopósido, VP; estaurosporina, STS.

En el producto de PCR de Smac beta se observaron bandas adicionales al producto esperado. Un estudio realizado con el agente cisplatino mostró la modulación de uno de los productos después de 8 y 12 horas de exposición al fármaco (Figura 11).

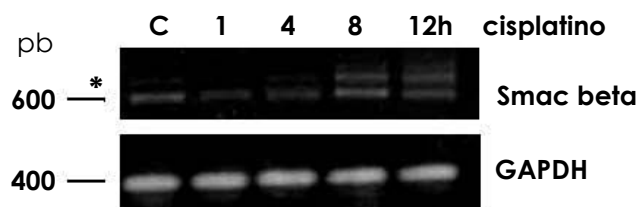


Figura 11. Expresión de Smac beta durante la apoptosis inducida por cisplatino. Células HeLa fueron expuestas a cisplatino (40  $\mu$ M) durante los tiempos indicados, se extrajo el ARN y se realizó el RT-PCR contra Smac beta. Se observa como otro producto de mayor tamaño (\*) es regulado positivamente durante el tratamiento. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga.

Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión y se analizaron estas secuencias. Las clonas obtenidas fueron amplificadas y secuenciadas. Dos posibles isoformas nuevas de Smac se encontraron, las cuales fueron clonadas en diferentes vectores para su caracterización (Anexo 3).

### ***Participación de las IAPs en la modulación de los niveles de Smac.***

A continuación los niveles de algunos miembros de la familia IAP se analizaron, ya que pueden regular los niveles de Smac a través de su degradación por la vía del proteosoma, mediada por el dominio RING. Se analizaron los niveles de XIAP, cIAP-1 y Survivina en proteínas totales por medio de Western blot. En la Figura 12A se observa una regulación dependiente del estímulo. Los niveles de XIAP disminuyeron en mayor proporción durante la apoptosis inducida por estaurosporina. cIAP-1 solo mostró un incremento en sus niveles durante la ausencia de suero (1.9 veces), mientras que los niveles de Survivina se incrementaron durante la exposición a etopósido (4.9 veces). El análisis del ARN



mensajero de las IAPs demostró que los cambios observados a nivel de proteína no se debieron a un mecanismo de regulación transcripcional (Figura 12B).

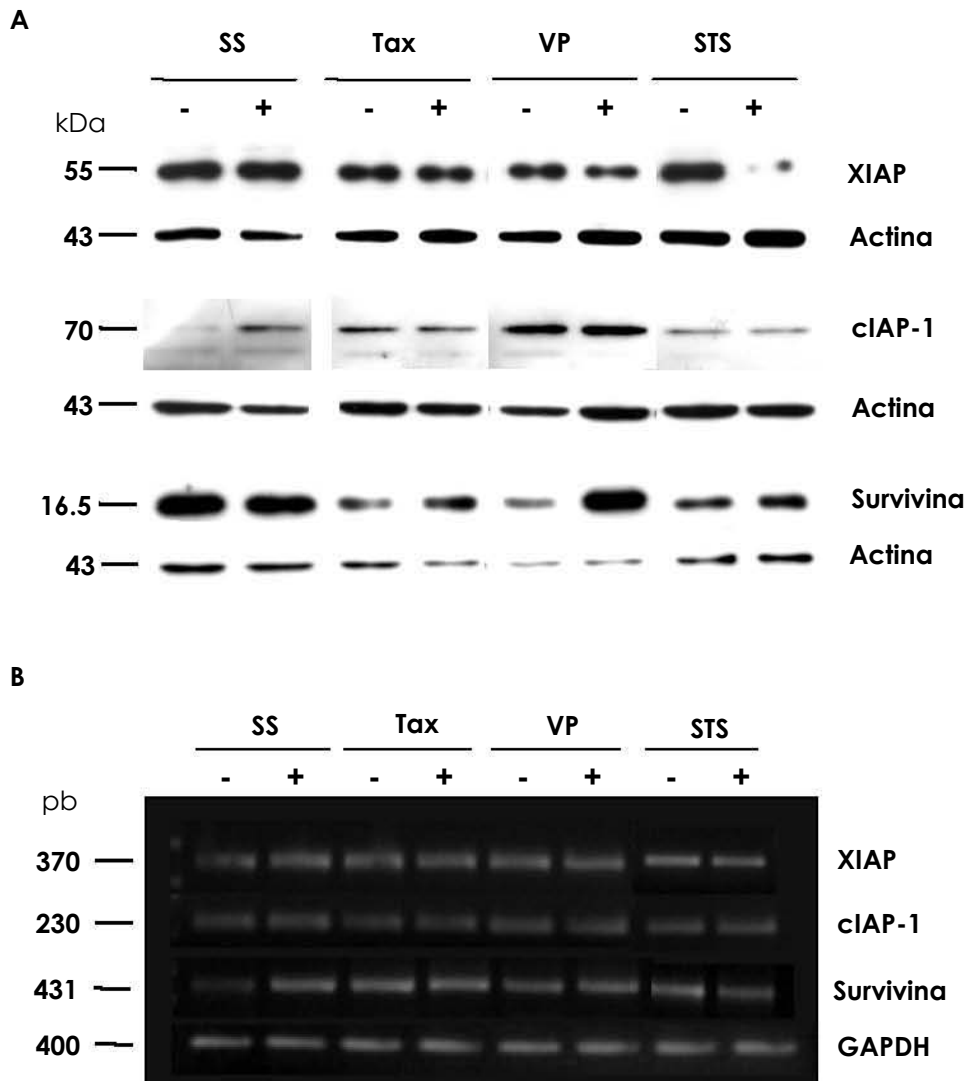


Figura 12. Modulación de la expresión de las IAPs durante la apoptosis inducida por los diferentes estímulos a la LD50. A) Western blot de proteínas totales para analizar la expresión de las diferentes IAPs. La expresión de actina se utilizó como control de carga. B) RT-PCR de las diferentes IAPs. La expresión de GAPDH se utilizó como control de carga. Ausencia de suero, SS; taxol, Tax; etopósido, VP; estaurosporina, STS.

La proteína Survivina es estabilizada al ser fosforilada en la treonina 34 por p34cdc2 (O'Connor et al., 2002). Para analizar si este mecanismo estaba involucrado en el incremento en los niveles de la Survivina observados durante la apoptosis inducida por etopósido, las células fueron tratadas con olomoucina, un inhibidor de p34cdc2. Como se muestra en la Figura 13 la olomoucina previno el incremento de la Survivina inducido por etopósido.

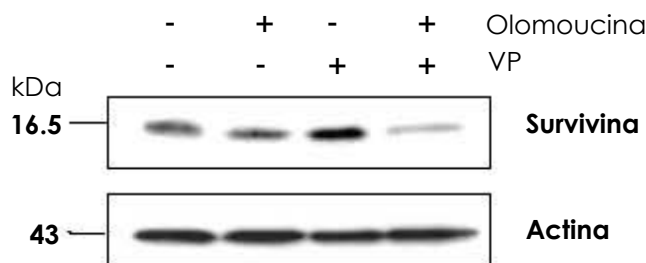


Figura 13. Estabilización de la Survivina por p34cdc2 durante la apoptosis inducida por etopósido. Las células fueron expuestas a la LD50 de etopósido más la olomoucina por 14 horas y las proteínas totales se analizaron por Western blot. La expresión de actina se utilizó como control de carga. VP, etopósido.

El aumento en los niveles de Survivina, cuando los niveles de Smac se mantuvieron constantes durante la apoptosis inducida por etopósido, y la disminución de XIAP y Smac durante el tratamiento con estaurosporina, sugiere que ambas IAPs están involucradas en la regulación de los niveles de Smac. Por esto se decidió profundizar en el estudio con estos dos estímulos apoptóticos.

***Liberación mitocondrial de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina.***

Al comparar la liberación al citosol de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina, se encontraron diferencias notables. Mientras que una menor concentración de citocromo c se liberó en las células tratadas con etopósido, los niveles de Smac en el citosol de estas células fueron mayores en comparación con estaurosporina (Figura 9). Para descartar la posibilidad de que algún defecto en la liberación de estas proteínas estuviera participando en la regulación de los niveles de Smac se analizaron los niveles de Smac en mitocondria. En la Figura 14A se observa que durante la apoptosis

inducida por estaurosporina hubo una mayor liberación de la mitocondria de citocromo c y Smac, como lo ilustra la disminución de sus niveles, mientras que con etopósido los niveles de estas proteínas se mantuvieron constantes. Adicionalmente, los niveles de Smac en el citosol de las células tratadas con estaurosporina no se incrementaron (Figura 14B), posiblemente debido a una rápida degradación como se ha reportado previamente (MacFarlane et al., 2002). En tanto, los niveles de Smac en el citosol de las células tratadas con etopósido fueron mayores en comparación con estaurosporina, lo cual sugiere la presencia de un mecanismo de estabilización (Figura 14B). Para analizar la posibilidad de que Smac se estuviera degradando por la vía del proteosoma durante la apoptosis inducida por estaurosporina, las células fueron tratadas con MG132, un inhibidor del proteosoma. En la Figura 8C se observa como el MG132 previno la degradación de Smac.

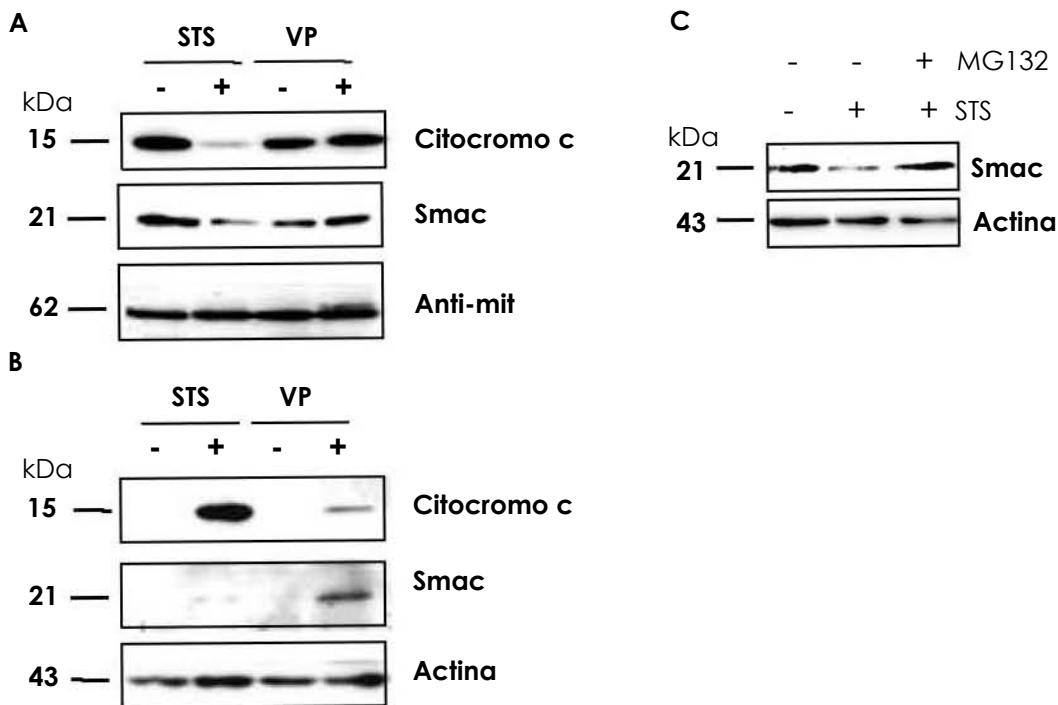


Figura 14. Liberación de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina. Las células fueron expuestas a la LD50 de los estímulos y se extrajeron las proteínas para analizarlas por Western blot. A) Proteínas mitocondriales, se utilizó un anticuerpo dirigido a una proteína mitocondrial como control de carga. B) Proteínas Citosólicas, la expresión de actina se utilizó como control de carga. C) Las células fueron expuestas a la LD50 de estaurosporina o estaurosporina más el MG132 por 8 horas. Los niveles de Smac totales se analizaron por Western blot. Mayores tiempos de exposición a MG132 resultaron ser tóxicos. STS, estaurosporina; VP, etopósido; Anti-mit, anti-mitocondria.

A continuación se realizó un curso temporal de la liberación de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido. Como se observa en la Figura 15, una mayor concentración de citocromo c se liberó de la mitocondria a las 60 horas, mientras que muy poco Smac se liberó en este tiempo.

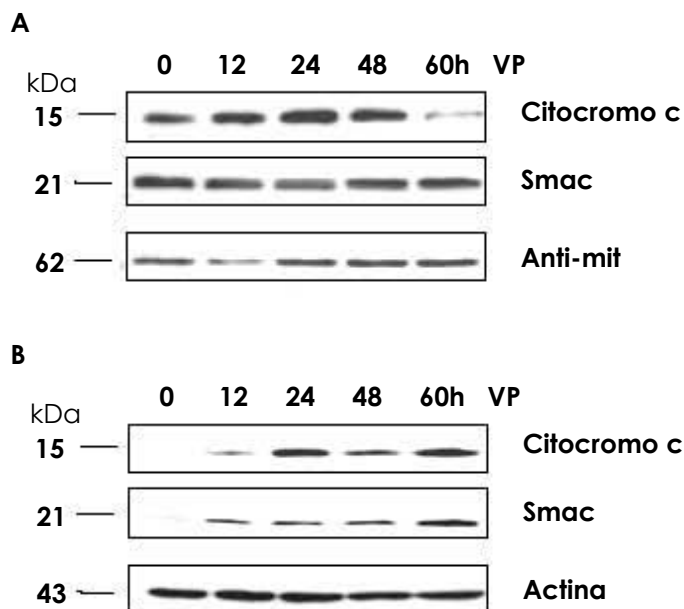


Figura 15. Curso temporal de la liberación de Smac y citocromo c durante la apoptosis inducida por etopósido. Las células fueron expuestas a la LD50 de etopósido por los tiempos indicados. Proteínas mitocondriales (A) y citosólicas (B) se extrajeron y se analizaron por Western blot. La expresión de una proteína mitocondrial y de actina se utilizaron como control de carga. VP, etopósido; Anti-mit, anti-mitocondria.

### ***Participación de la familia de Bcl-2 y de las caspasas en la liberación de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido.***

La liberación de las proteínas mitocondriales durante la apoptosis es regulada por la familia de proteínas de Bcl-2, con miembros antiapoptóticos que la inhiben, y miembros proapoptóticos que la estimulan. Para analizar si este mecanismo estaba alterado en nuestro modelo, se analizó por Western blot la presencia de la proteína antiapoptótica Bcl-2, y de las proapoptóticas Bax y Bid en la fracción mitocondrial de las células expuestas a etopósido. En la Figura 16A se observa que los niveles de Bax se incrementan en la mitocondria durante el tratamiento, mientras que los de Bcl-2 disminuyen. Un curso temporal permitió observar que Bid

truncado comenzó a acumularse en la mitocondria a partir de las 36 horas, mientras que Bax lo hizo a tiempos más tempranos, a partir de las 12 horas (Figura 16B). Estos resultados sugirieron que este mecanismo no estaba alterado en este modelo.

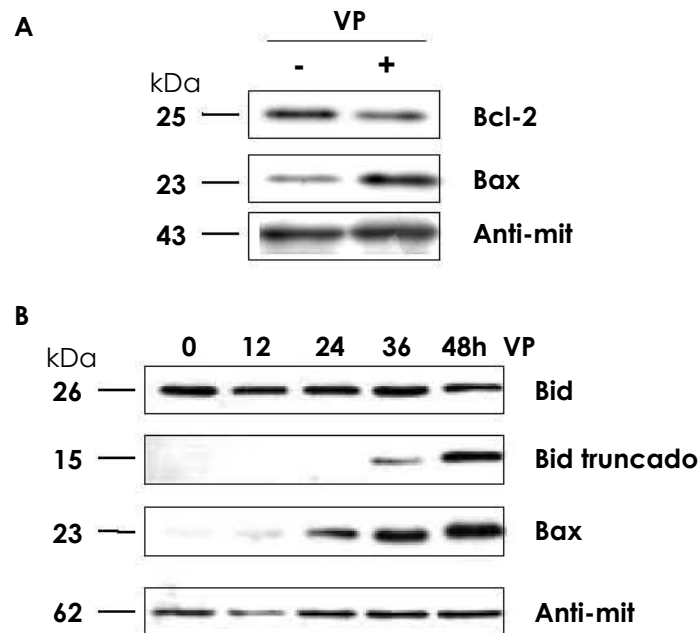
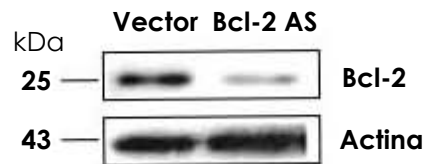


Figura 16. Translocación de proteínas de la familia Bcl-2 a la mitocondria durante la apoptosis inducida por etopósido. Western blot en proteínas mitocondriales de células expuestas a la LD50 del etopósido por 48 h (A) y durante un curso temporal (B) donde se analiza la presencia de algunos miembros de la familia de Bcl-2. La expresión de una proteína mitocondrial se utilizó como control de carga. VP, etopósido; anti-mit, anti-mitocondria.

Para asegurar que la proteína Bcl-2 no estaba involucrada en la liberación de las proteínas mitocondriales durante la apoptosis inducida por etopósido, se inhibió la expresión de esta proteína y se analizó la liberación de Smac y citocromo c. En la Figura 17A se observa la inhibición por la expresión de una construcción de antisentido de Bcl-2. Cuando estas células con niveles reducidos de Bcl-2 fueron expuestas a la LD50 de etopósido por 48h, se observó que la liberación de Smac al citosol no presentó cambios, mientras que hubo una mayor liberación de citocromo c (Figura 17B).

**A**



**B**

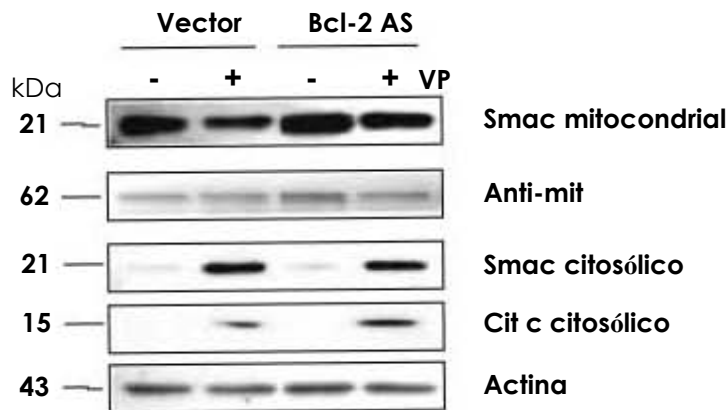


Figura 17. Participación de Bcl-2 en la liberación mitocondrial de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido. A) Western blot de proteínas totales que muestra la disminución en los niveles de Bcl-2 por la expresión de un antisentido (Bcl-2 AS). Como control de carga se utilizó la expresión de actina. B) Western blot en proteínas mitocondriales y citosólicas de células expuestas a la LD50 de etopósido por 48h, transfectadas con el antisentido de Bcl-2. La expresión de una proteína mitocondrial y de actina se utilizaron como controles de carga. VP, etopósido.

Por otra parte, se ha reportado que el etopósido induce un mecanismo de retroalimentación positiva que involucra a las caspasas para poder liberar a las proteínas de la mitocondria. Para analizar si este mecanismo estaba alterado, se analizó por Western blot la activación de caspasas durante un curso temporal. Como se muestra en la Figura 18 las caspasas 9, 3 y 8 se activaron al mismo tiempo, alrededor de las 24 horas, lo que coincide con la translocación de Bax. Estos resultados mostraron que las caspasas se activaron después de la translocación de Bax y permanecieron activas durante la apoptosis inducida por el etopósido, lo que indica que este mecanismo tampoco estaba alterado.

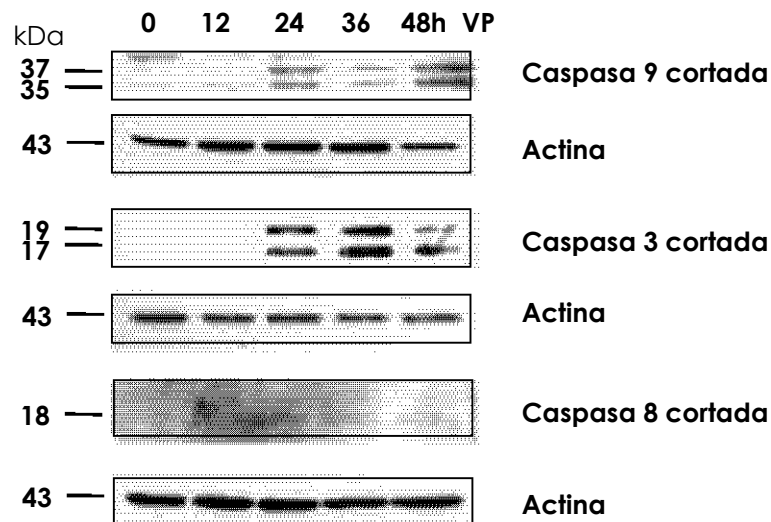


Figura 18. Análisis de la activación de caspasas durante la apoptosis inducida por etopósido. Western blot de proteínas citosólicas de células expuestas a la LD50 de etopósido por los tiempos indicados. Se utilizaron anticuerpos que reconocen a las caspasas activas. La expresión de actina se utilizó como control de carga. VP, etopósido.

***Regulación de la expresión y distribución subcelular de la Survivina durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina.***

La exposición a etopósido indujo la sobreexpresión de la Survivina. Las isoformas de esta presentan diferente localización subcelular, por lo que a continuación se analizó por Western blot la expresión de la Survivina en fracciones citosólicas, mitocondriales y nucleares. Como se observa en la Figura 19A el tratamiento con etopósido indujo un incremento de la Survivina en todas las fracciones analizadas, al contrario de la estaurosporina, donde solo se observó una redistribución en la fracción nuclear. Adicionalmente se analizó la distribución de una isoforma de la Survivina, la Survivina DEX3, la cual se incrementó en menor grado en las fracciones mitocondrial y nuclear (Figura 19B).

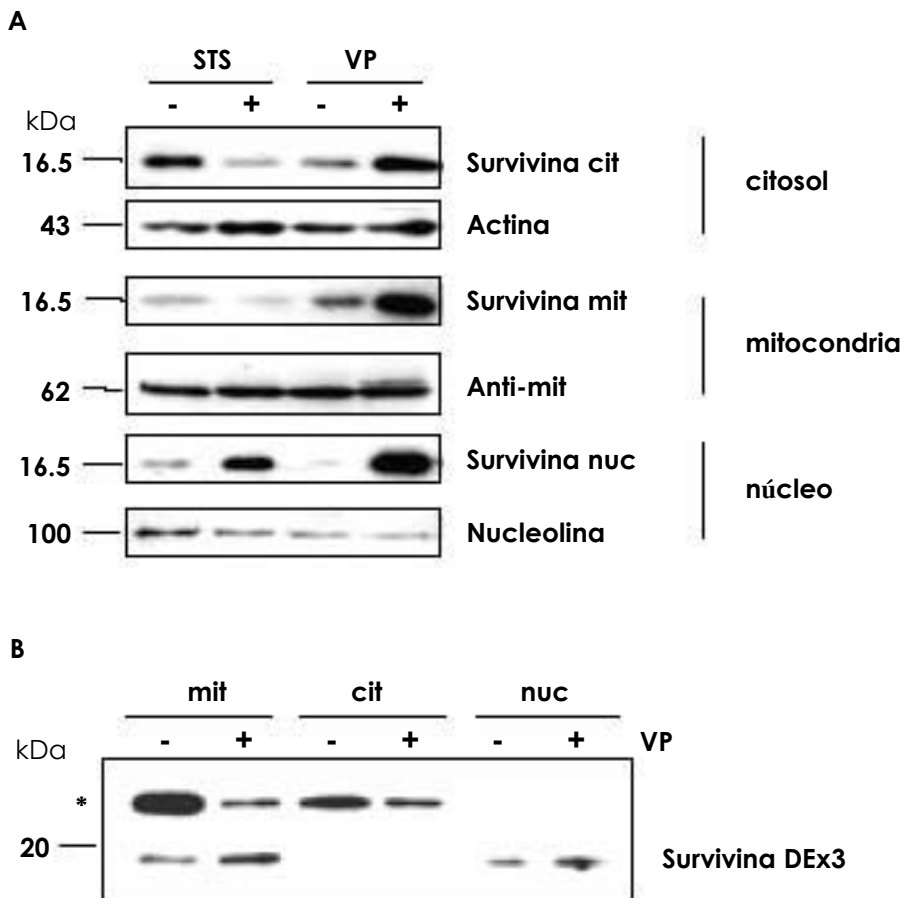


Figura 19. Distribución subcelular de la Survivina y Survivina DEx3 durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina. Western blot de fracciones citosólicas, mitocondriales y nucleares de células expuestas a la LD50 de etopósido y estaurosporina, para determinar la expresión de Survivina (A) y Survivina DEx3 (B). La expresión de actina, nucleolina y una proteína mitocondrial se utilizaron como controles de carga. STS, estaurosporina; VP, etopósido; \* banda inespecífica.



### ***Participación de la Survivina en la regulación de la liberación mitocondrial de Smac/DIABLO.***

Para determinar si el incremento en los niveles de Survivina estaba involucrado en la liberación retrasada y en la estabilización de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido, se utilizó la técnica de ARN de interferencia. La expresión de Survivina y Survivina DEx3 fue inhibida eficientemente por los ARN de interferencia diseñados y validados en el laboratorio por Espinosa y col. Los plásmidos que expresaban los ARN de interferencia fueron transfectados transitoriamente en las células y posteriormente fueron expuestas a la LD50 de etopósido, se extrajeron proteínas citosólicas, mitocondriales y totales, y por Western blot se analizaron los niveles de Smac y citocromo c. Como se muestra en la Figura 20A las células con niveles reducidos de Survivina y Survivina DEx3, expuestas a etopósido, mostraron mayor liberación de Smac, como lo demuestra la disminución en sus niveles mitocondriales, además de que los niveles citosólicos de Smac fueron menores. Esta disminución se observó también en los niveles totales de Smac (Figura 20B). Como se esperaba, la inhibición de la Survivina y Survivina DEx3 sensibilizó a las células al tratamiento con etopósido, como lo demuestra la disminución en la viabilidad (Figura 20C).

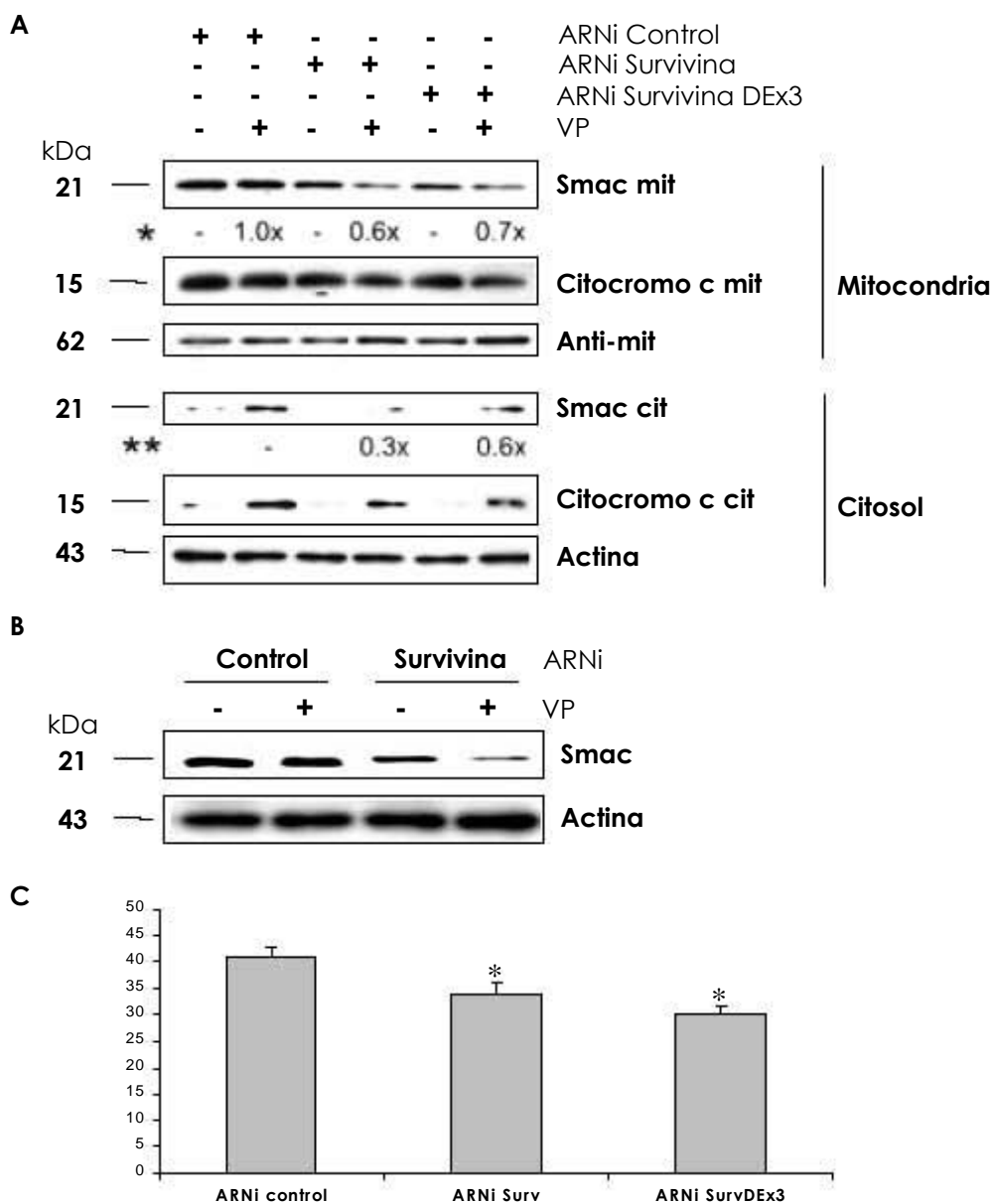


Figura 20. Papel de la Survivina y Survivina DEx3 en la regulación de la liberación mitocondrial de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido. A) Western blot de fracciones mitocondriales y citosólicas de células transfectadas con los ARN de interferencia y expuestas a la LD50 de etopósido por 48 horas. Se analizó la expresión de Smac, citocromo c y los respectivos controles de carga. \*, \*\* Análisis densitométrico mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). B) Western blot contra Smac en proteínas totales de células transfectadas con el ARN de interferencia de Survivina y expuestas a la LD50 de etopósido por 48 horas. C) Viabilidad celular analizada por la técnica de cristal violeta. Las células transfectadas con los ARN de interferencia indicados fueron expuestas a la LD50 de etopósido por 48 horas. \*  $p < 0.05$ .

Smac y Survivina se ha reportado que se asocian durante la apoptosis inducida por taxol (Song et al., 2003), reduciendo así el antagonismo de Smac sobre XIAP e inhibiendo la apoptosis. Como era de esperarse, las células transfectadas con el ARN de interferencia para Survivina y expuestas a taxol, mostraron niveles reducidos de Smac (Figura 21A). Adicionalmente, los niveles de XIAP disminuyeron en las células con niveles reducidos de Survivina y Survivina DEx3, y expuestas a etopósido (Figura 21B).

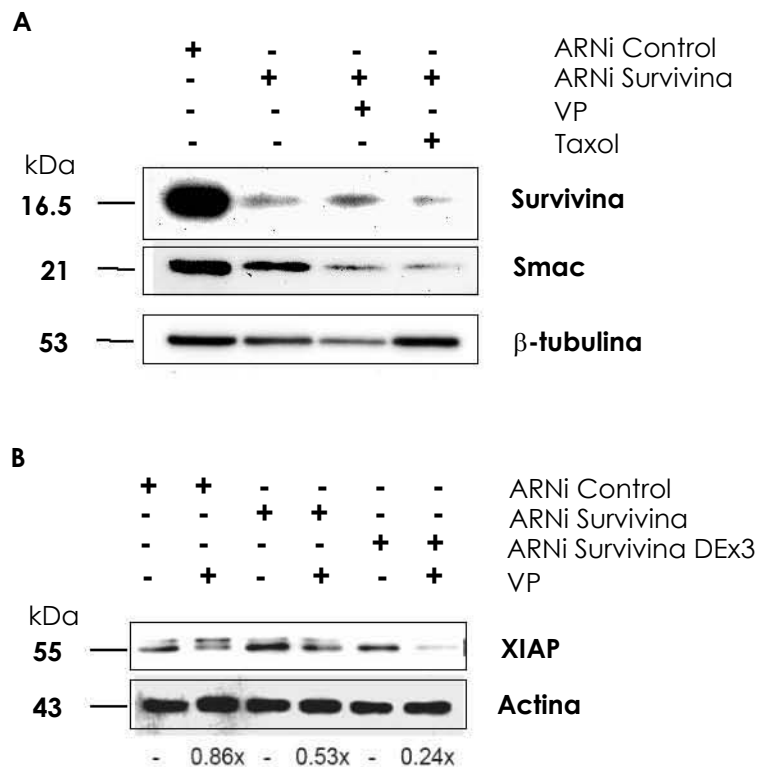


Figura 21. Efecto de la inhibición de la Survivina y Survivina DEx3 sobre los niveles de Smac y XIAP. A) Western blot de proteínas totales de células transfectadas con al ARN de interferencia de Survivina y expuestas a la LD50 de etopósido y taxol. La expresión de β-tubulina se utilizó como control de carga. B) Western blot de proteínas citosólicas de células transfectadas con los ARN de interferencia de Survivina y Survivina DEx3, y expuestas a la LD50 de etopósido. La expresión de actina se utilizó como control de carga. El análisis densitométrico de tres experimentos independientes normalizado se muestra en la parte inferior (x= veces de cambio respecto a cada control).

Posteriormente para reforzar los resultados obtenidos, se creó una línea celular estable que sobre expresara a la Survivina (HeLaSurv) y se expuso a la LD50 de estaurosporina. Como se muestra en la Figura 22A las células HeLaSurv

sobreexpresaron a la Survivina, además de que los niveles de Smac en estas células se incrementaron de manera significativa. La exposición a estaurosporina en estas células no indujo la liberación de Smac de la mitocondria, como se observa además por los bajos niveles de esta proteína en el citosol, a pesar de que los niveles mitocondriales de Survivina disminuyeron con el tratamiento (Figura 22B). La sobreexpresión de Survivina previno la disminución de los niveles totales de Smac y XIAP inducidos por el tratamiento con estaurosporina (Figura 22C).

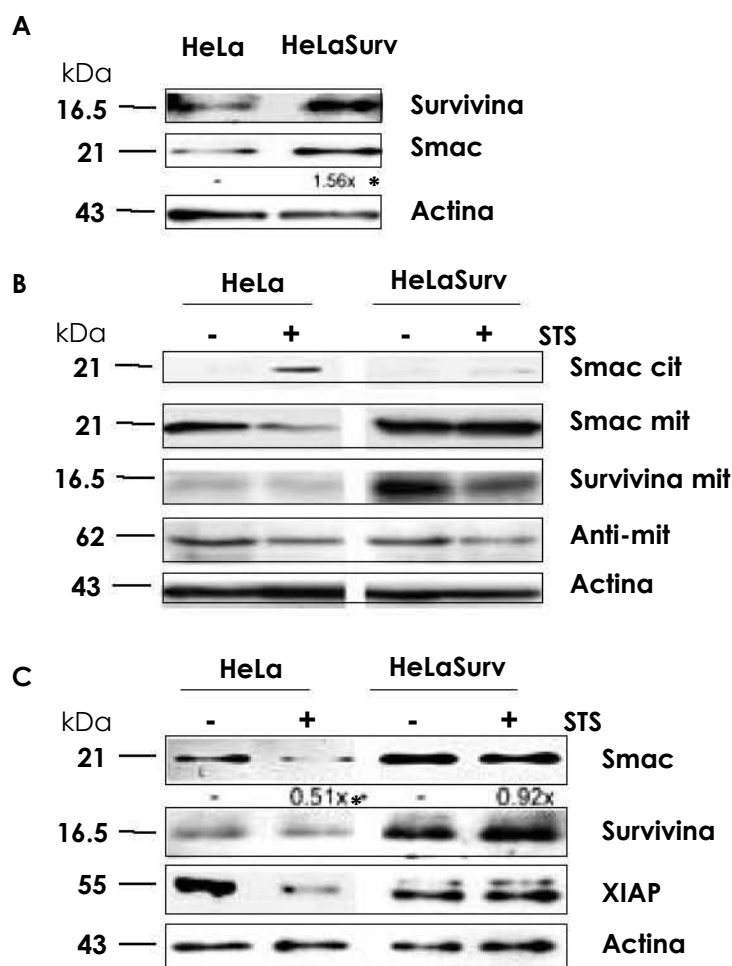


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de Survivina en la liberación mitocondrial de Smac durante la apoptosis inducida por estaurosporina. A) Western blot de proteínas totales con los anticuerpos indicados. \* Análisis densitométrico,  $p < 0.05$ . B) Western blot de proteínas citosólicas y mitocondriales de células expuestas a la LD50 de estaurosporina (STS) por 24 h. La expresión de Actina y una proteína mitocondrial (Anti-mit) se utilizaron como control de carga. Cit, citosol; mit, mitocondria. C) Western blot de proteínas totales de células expuestas a la LD50 de estaurosporina, con los anticuerpos indicados. \* Análisis densitométrico mostró diferencias significativas en las células HeLaSurv respecto a las control, transfectadas con el vector vacío ( $p < 0.05$ ).

La sobre expresión de la Survivina además protegió a las células de la apoptosis inducida por estaurosporina (Figura 23A) y se observó una disminución de la activación de la caspasa 3 (Figura 23B). Adicionalmente, la morfología de las células también mostró diferencias durante la exposición a la estaurosporina (Figura 23C).

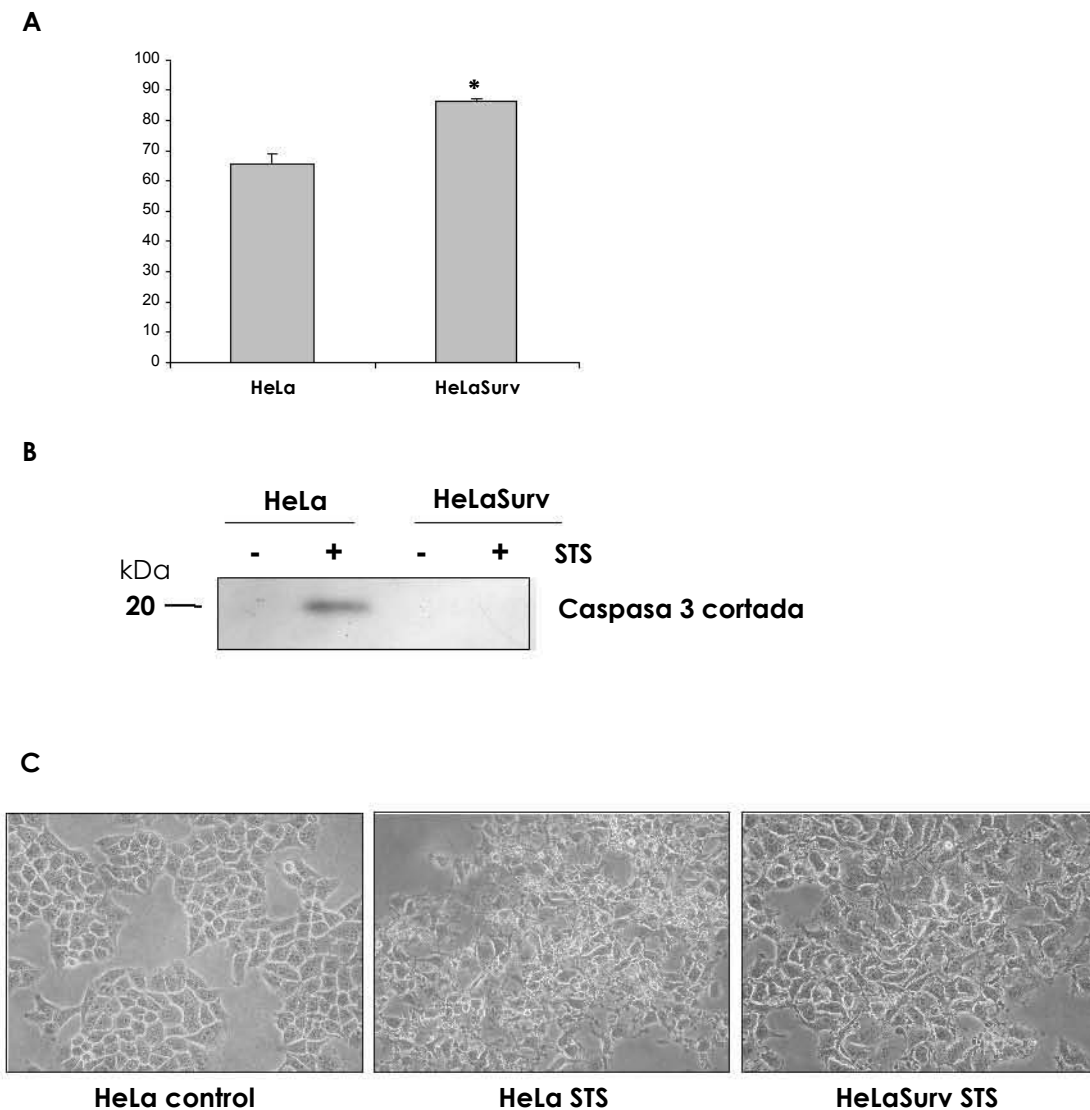


Figura 23. La sobreexpresión de Survivina disminuyó la apoptosis inducida por estaurosporina. A) Viabilidad celular evaluada con la técnica de cristal violeta, de células expuestas a la LD50 de estaurosporina por 24 horas. \*,  $p < 0.05$ . B) Western blot de proteínas totales de células expuestas a la LD50 de estaurosporina para evaluar la activación de la caspasa 3. C) Morfología celular de las células transfectadas expuestas a la LD50 de estaurosporina. STS, estaurosporina.

## VII. DISCUSIÓN

Smac es una importante proteína mitocondrial que elimina el efecto inhibitorio de las IAPs sobre las caspasas, potenciando así la apoptosis. La liberación de esta proteína al citosol se considera el principal mecanismo de regulación de esta proteína, aunque otros mecanismos de regulación han sido poco estudiados. Sin embargo, se ha observado la desregulación de Smac en cáncer cervicouterino (Espinosa *et al.*, 2004; Arellano-Llamas *et al.*, 2006), sarcomas (Yoo *et al.*, 2003), cáncer de pulmón (Sekimura *et al.*, 2004) y tumores renales (Mizutani *et al.*, 2005). Adicionalmente, las alteraciones en la expresión de Smac son capaces de afectar el umbral apoptótico.

Debido a lo anterior, en este trabajo se abordaron diversos niveles de regulación de Smac durante la apoptosis intrínseca o mitocondrial.

### **Apoptosis mitocondrial en células HeLa.**

La apoptosis mitocondrial o intrínseca puede ser inducida por estrés celular, irradiación ultravioleta, agentes quimioterapéuticos y ausencia de factores de crecimiento. Las señales transducidas por estos estímulos convergen en la mitocondria, induciendo la liberación de proteínas intermembranales, como citocromo c, y activación de la cascada de la caspasa 9. Por esto se piensa generalmente que la apoptosis inducida por estos estímulos podría llevarse a cabo de manera similar.

En esta investigación se seleccionaron como inductores de la apoptosis mitocondrial cuatro estímulos: ausencia de suero, taxol, etopósido y estaurosporina. Para hacer una comparación de los eventos moleculares implicados en las vías de inducción de muerte, se determinó primero la LD50 de los tratamientos en las células HeLa. La LD50 de cada uno fue dependiente del tiempo de exposición y concentración del estímulo (Figura 6).

Aunque estos estímulos tienen diferentes blancos celulares (Anexo 2) todos coincidieron en inducir la condensación nuclear característica de la apoptosis (Figura 7), la activación de caspasas (Figura 8), corte de PARP (Figura 8), y liberación de citocromo c y Smac al citosol (Figura 9). Sin embargo, se encontraron algunas diferencias.

Durante la apoptosis inducida por taxol y por ausencia de suero se observó la activación de las caspasas 9 y 3. Durante la muerte inducida por estaurosporina la activación de las caspasas 8 y 3 fue más importante en comparación con etopósido, donde las caspasas 9 y 7 fueron las principalmente activadas (Figura 8). Estos resultados coinciden con la literatura reportada, donde se ha observado la participación de las caspasas 9 y 3 en la apoptosis inducida por ausencia de suero (Goyeneche *et al.*, 2006), así como la importancia de la caspasa 8 en la apoptosis inducida por estaurosporina, y de las caspasas 9 y 7 en la muerte inducida por etopósido (Stepczynska *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2005).

Adicionalmente, el corte de PARP, un sustrato conocido de la caspasa 3, tampoco fue similar entre los estímulos. La presencia del fragmento de PARP no correlacionó directamente con la activación de la caspasa 3. Se ha reportado que la caspasa 7 es más eficiente en cortar PARP que la caspasa 3 (Germain *et al.*, 1999). Tal es el caso de la apoptosis inducida por etopósido, donde se observó una mayor activación de la caspasa 7 y corte de PARP, en comparación con estaurosporina.

La liberación de citocromo c y Smac al citosol durante la apoptosis inducida por los estímulos también mostró diferencias. Durante la apoptosis inducida por ausencia de suero y taxol se observaron niveles similares de Smac en el citosol, mientras que una menor cantidad de citocromo c se observó durante el tratamiento con taxol en comparación con la ausencia de suero. En las células tratadas con etopósido se observaron niveles bajos de citocromo c en el citosol, mientras que los niveles de Smac fueron mayores en comparación con estaurosporina, donde se observó una mayor liberación de citocromo c, pero

niveles bajos de Smac citosólico (Figura 9). Estas diferencias podrían ser el resultado de alteraciones en el proceso de liberación mitocondrial de estas proteínas, o deberse a mecanismos que regulan los niveles de Smac en el citosol.

Las diferencias observadas en la activación de las caspasas y la liberación al citosol de proteínas mitocondriales inducidas por los estímulos, sugirieron divergencias en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

### **Regulación de los niveles de Smac durante la apoptosis.**

Para estudiar el efecto de los estímulos apoptóticos sobre los niveles de la proteína Smac, se analizó su expresión por medio de Western blot. Durante la apoptosis inducida por ausencia de suero y taxol se observó la disminución de los niveles de Smac. Sin embargo, el tratamiento con estaurosporina indujo la mayor disminución en los niveles de esta proteína. De manera interesante, la exposición a etopósido no produjo cambios en los niveles de Smac respecto a las células control (Figura 10A).

Para descartar la participación de un mecanismo de regulación transcripcional en los resultados anteriores, se analizó la expresión del ARN mensajero de dos isoformas de la proteína, smac alfa y smac beta. La apoptosis inducida por ausencia de suero y taxol provocó un incremento en los niveles de ambas isoformas, mientras que durante la exposición a etopósido y estaurosporina los niveles de las dos isoformas no presentaron cambios importantes (Figura 10B).

La regulación del ARN mensajero de Smac ha sido poco estudiada. Se ha observado que la expresión del ARN mensajero es regulada positivamente por  $IFN\gamma$  (Yoshikawa *et al.*, 2001) y AMPc (Martínez-Velázquez *et al.*, 2007), y esta regulación positiva tuvo un papel importante en la promoción de la apoptosis por ambas moléculas. Por otra parte, se ha reportado que la apoptosis inducida por ausencia de suero resulta de la inducción y secreción de interferones del tipo I, aunque las células donde se realizó este estudio no expresan interferón del tipo II,



como IFN $\gamma$  (Wel *et al.*, 2006). Por lo tanto sería interesante evaluar el papel del interferón en la modulación del ARN mensajero de Smac en las células HeLa. Además, se ha observado que el AMPc puede sensibilizar a las células de cáncer a los efectos del taxol (Maldonado *et al.*, 1996). Posiblemente esto se deba, al menos en parte, a la inducción de la expresión de Smac. Los resultados observados a nivel de ARN mensajero de Smac no explican las diferencias observadas a nivel de proteína durante el proceso apoptótico, lo que sugiere la participación de diversos mecanismos de regulación de esta proteína durante el proceso apoptótico.

### **Participación de las IAPs en la modulación de los niveles de Smac.**

Existe evidencia de que miembros de la familia IAP pueden regular los niveles de la proteína Smac (Vaux y Silke, 2005). Por esta razón se analizaron los niveles de algunos miembros de la familia IAP durante la apoptosis inducida por los estímulos.

Los niveles de las IAPs analizadas se modularon diferencialmente dependiendo del estímulo apoptótico. Los niveles de cIAP-1 se incrementaron durante la apoptosis inducida por ausencia de suero, y la expresión de Survivina se incrementó importantemente durante la exposición a etopósido, mientras que durante el tratamiento con estaurosporina se observaron los niveles más bajos de XIAP (Figura 12A). El análisis del ARN mensajero de estas IAPs mostró que los cambios observados a nivel de proteína no se debieron a un mecanismo de regulación transcripcional (Figura 12B).

El incremento en los niveles de cIAP-1 durante la apoptosis inducida por ausencia de suero no explica la sensibilidad a la apoptosis; sin embargo, es probable que el aumento en los niveles del ARN mensajero de Smac esté involucrado en el proceso de muerte.

La sobre expresión de la Survivina se ha observado en células de cáncer expuestas a diversos agentes antineoplásicos, como la adriamicina y el taxol (Wall

et al., 2003), lo que sugiere que esta regulación de la Survivina pudiera ser un efecto general de estas drogas. Por otra parte, se ha reportado que la Survivina puede ser estabilizada por fosforilación por parte del complejo ciclina B/cdc2, y que esta fosforilación es importante para que pueda inhibir a la caspasa 9, y en consecuencia la apoptosis mitocondrial (O'Connor et al., 2000). En nuestro modelo, la exposición de células a etopósido y olomoucina, un inhibidor farmacológico de cdc2, demostró la participación de esta cinasa en el incremento de los niveles de Survivina observados durante la apoptosis inducida por etopósido (Figura 13).

Por otra parte, se ha reportado que la estaurosporina puede disminuir la activación de la proteína Akt, al inhibir su fosforilación (Tenzer et al., 2001; Sato et al., 2002), así como a través de la inhibición de PDK1, su activador río arriba (Hill et al., 2001; Sato et al., 2002). Adicionalmente se ha reportado que Akt se une y fosforila a XIAP, y que esta fosforilación protege a XIAP de la autoubiquitinación, y de la ubiquitinación y degradación (Dan et al., 2004). Esto podría explicar la disminución en los niveles de la proteína XIAP durante la apoptosis inducida por estaurosporina.

Varios estudios reportan que la proteína Smac puede ser regulada por ubiquitinación y degradación promovida por miembros de la familia IAP, a través de su actividad de ligasa de ubiquitina localizada en el dominio BIR. XIAP, cIAP-1, cIAP-2, BRUCE y ML-IAP pueden inducir la degradación de Smac (MacFarlane et al., 2002; Hu y Yang, 2003; Wilkinson et al., 2004; Yang y Du, 2004; Hao et al., 2004; Qiu y Goldberg, 2005; Ma et al., 2006). Aunque se ha sugerido que tanto Smac como la IAP unida son degradadas en el complejo (Vaux y Silke, 2005), solo en un reporte se observó una aparente disminución en los niveles de Smac al inducir la degradación de cIAP-1 y cIAP-2 (Yang y Du, 2004).

Durante la apoptosis inducida por ausencia de suero, es posible que cIAP-1 estuviera involucrado en la disminución de los niveles de Smac. Sin embargo, la regulación positiva del ARN mensajero podría estar involucrada en la regulación

de los niveles de la proteína. El mismo caso se presenta para el estímulo Taxol, donde la disminución en los niveles de la proteína de Smac, observados durante el proceso apoptótico, podrían ser regulados en parte por algún miembro de la familia IAP, además del efecto de la modulación del ARN mensajero.

En el caso de la apoptosis inducida por estaurosporina, la reducción en los niveles de Smac podría deberse a una interacción con XIAP y degradación del complejo, debido a la autodegradación de XIAP. El mantenimiento de los niveles de Smac durante la exposición al etopósido podría deberse a la asociación de Survivina con Smac, ya que la Survivina no posee dominio de ligasa de ubiquitina, evita la interacción de Smac con otras IAPs que pudieran degradarlo. Se ha reportado que Smac y Survivina se asocian durante la apoptosis inducida por taxol, y que esta asociación es importante para el efecto antiapoptótico de la Survivina, que disminuye el antagonismo de Smac sobre XIAP (Song *et al.*, 2003).

### **Etopósido y estaurosporina inducen diferentes cinéticas de liberación de Smac y citocromo c.**

Debido a que durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina, los niveles de Smac parecen estar regulados principalmente por el balance de las IAPs, se decidió continuar el estudio solo con estos dos agentes.

Aunque los niveles de las IAPs parecen estar involucrados en la regulación de los niveles de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina, anteriormente se habían observado diferencias en cuanto a la liberación al citosol de esta proteína y de citocromo c (Figura 9). Por esto se decidió profundizar en el estudio de este mecanismo.

A pesar de haber utilizado la LD50 de los dos estímulos, se encontraron claras diferencias en la liberación de Smac y citocromo c. Las células expuestas a etopósido mostraron una menor liberación mitocondrial de ambas proteínas en comparación con estaurosporina. A pesar de esto, los niveles de Smac en el

citocromo c de células expuestas a etopósido fueron mayores en comparación con estaurosporina (Figura 14). Aún a tiempos de exposición mayores al etopósido se observó la liberación mitocondrial de citocromo c, pero no la de Smac (Figura 15).

Se ha reportado que la liberación de citocromo c y de Smac de la mitocondria después de un estímulo apoptótico puede ser regulada individualmente. Kandasamy y colaboradores (2003) mostraron que después de la exposición a TRAIL, fibroblastos embrionarios de ratón Bid (-/-), Bax (-/-) o Bak (-/-) liberaron citocromo c, pero no Smac. En contraste, otros investigadores han reportado que estímulos específicos, como la luz ultravioleta, pueden inducir la liberación simultánea de citocromo c y Smac (Zhou *et al.*, 2005). Por lo tanto, aún no existe una clara comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la liberación de estas proteínas, mecanismos que podrían depender de los estímulos apoptóticos utilizados.

### **Participación de la familia de Bcl-2 y de las caspasas en la liberación de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido.**

Se considera que la familia de proteínas Bcl-2 son los principales reguladores de la salida de proteínas de la mitocondria. De los miembros antiapoptóticos de esta familia, se ha observado que la familia Bax participa en la permeabilización de la membrana mitocondrial, mientras que de la familia "solo BH3", Bid truncado induce la oligomerización de Bax y Bak para formar los poros en la membrana mitocondrial (Cory y Adams, 2002).

Se ha reportado que la exposición de células de cáncer al etopósido induce la acumulación de Bax en la mitocondria causando la liberación de citocromo c y la muerte celular (Karpnich *et al.*, 2002). Por esto se estudió la participación de diferentes miembros de la familia Bcl-2 en la liberación mitocondrial de Smac en nuestro modelo. Se observó el incremento de Bax y Bid en la mitocondria de las células expuestas al etopósido, así como la disminución de Bcl-2 (Figura 16). La

disminución de los niveles de Bcl-2 por un antisentido no indujo cambios en los niveles mitocondriales y citosólicos de Smac durante la apoptosis inducida por etopósido, aunque se incrementaron los niveles citosólicos de citocromo c (Figura 17). Estos resultados sugirieron que Bcl-2 no estaba participando en la liberación retrasada de Smac observada en la apoptosis inducida por etopósido.

Adicionalmente, existe controversia en si la liberación de Smac y citocromo c de la mitocondria depende de caspasas activas (Adrain *et al.*, 2001; Arnoult *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005). Se ha reportado que el etopósido induce un mecanismo de retroalimentación positiva que involucra a las caspasas activas y a la mitocondria (Chen *et al.*, 2000). Por esto se estudió también la participación de estas proteínas. Sin embargo, las caspasas 9, 3 y 8 se activaron después de 24 horas de exposición al etopósido, lo que coincide con la translocación de Bax a la mitocondria. Estos resultados mostraron que las caspasas se activaron después de la translocación de Bax a la mitocondria y se mantuvieron activas durante la apoptosis inducida por el etopósido (Figura 18), lo que sugiere que este mecanismo está intacto en nuestro modelo.

### **Expresión y distribución subcelular de la Survivina durante la apoptosis inducida por etopósido y estaurosporina.**

Debido a que la exposición a etopósido indujo la sobre expresión de la Survivina, se analizó la posibilidad de que esta proteína fuera la responsable de los efectos del etopósido sobre los niveles de Smac. La Survivina tipo, aunque se ha descrito preferentemente como una proteína citosólica, también se ha encontrado en el núcleo (Fortugno *et al.*, 2002). Además se ha descrito una población mitocondrial con potencial antiapoptótico (Dohi *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha reportado que los heterodímeros formados por la Survivina y su isoforma, Survivina DEx3, se localizan en la mitocondria y que de esta forma podrían inhibir la apoptosis intrínseca (Caldas *et al.*, 2005).

Debido a lo anterior se analizó la expresión de la Survivina y la Survivina DEx3 en diferentes compartimientos subcelulares durante el proceso apoptótico inducido por etopósido y estaurosporina. El etopósido indujo el incremento de la Survivina en citosol, mitocondria y núcleo, mientras que la estaurosporina sólo indujo una redistribución de la Survivina al núcleo. Adicionalmente se observó un pequeño incremento de la Survivina DEx3 en mitocondria y núcleo durante la apoptosis inducida por etopósido (Figura 19).

### **Participación de la Survivina en la regulación de la liberación mitocondrial de Smac.**

Se ha sugerido que la survivina tiene un papel más selectivo para inhibir la apoptosis mitocondrial. Cuando la expresión de la survivina ha sido inhibida, la muerte celular tiene características de la vía intrínseca, como la liberación de citocromo c, la activación de la caspasa 9, el requerimiento de componentes del apoptosoma (Altieri, 2003), y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (Altieri, 2004). Además, ratones heterocigotos para *survivina* mostraron ser más sensibles a la muerte dependiente de la mitocondria (Altieri, 2003).

Para evaluar la participación de la Survivina en la liberación retrasada de Smac y su estabilización en el citosol de las células expuestas al etopósido, se utilizaron ARNs de interferencia contra la Survivina y la Survivina DEx3. Los ARNs de interferencia utilizados mostraron ser efectivos en reducir los niveles de ambas proteínas. La inhibición de la expresión de las isoformas de la Survivina en células expuestas a etopósido, indujo la liberación mitocondrial de Smac y la pérdida de la estabilización de Smac en el citosol. Lo anterior se reflejó en la disminución de los niveles totales de Smac y XIAP, y una mayor sensibilidad a la muerte inducida por el etopósido.

La estrategia inversa para reforzar estos resultados fue sobre expresar a la Survivina en células expuestas a estaurosporina. El incremento de la Survivina

previno la liberación mitocondrial de Smac y la disminución de los niveles totales de Smac y XIAP inducidos por la estaurosporina. Adicionalmente, la sobreexpresión de Survivina protegió a las células de la muerte inducida por la estaurosporina y bloqueó la activación de la caspasa 3.

La liberación retrasada de Smac de la mitocondria podría ser mediada por la unión directa de la Survivina con Smac. En ensayos de coimmunoprecipitación, se ha demostrado la asociación de estas dos proteínas en la mitocondria durante la apoptosis inducida por etopósido. La Survivina podría afectar la salida de Smac de la mitocondria por un simple mecanismo de exclusión de tamaño. Previamente se había reportado que la Survivina y Smac citosólico interactúan durante la apoptosis inducida por taxol (Song *et al.*, 2003). Recientemente se ha demostrado que estas dos proteínas además interactúan en el núcleo durante la apoptosis inducida por docetaxel (Kim *et al.*, 2007).

Los resultados presentados proporcionan una explicación para los reportes contradictorios acerca del mecanismo de liberación de citocromo c y Smac durante la apoptosis (Zhou *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006). Los estímulos que inducen la sobre expresión de la Survivina deberían bloquear o retrasar la salida de Smac de la mitocondria, aún en presencia de la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial que podría permitir su liberación.

Tanto la liberación mitocondrial retrasada de Smac, como el bloqueo de la disminución de sus niveles totales, inducidos por la sobre expresión de la Survivina, deberían disminuir la sensibilidad de las células de cáncer a la apoptosis y por lo tanto proporcionar un posible mecanismo de resistencia a las drogas. En apoyo a esta afirmación, se ha observado que la resistencia a taxol en células de cáncer de tiroides está asociada con niveles incrementados de Survivina y reducida liberación de Smac de la mitocondria (Tirro *et al.*, 2006). Debido a que diversos agentes antineoplásicos inducen la sobre expresión de la Survivina (Wall *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2004), sería interesante analizar si estos agentes afectan de igual forma la actividad de Smac en mitocondria y citosol. Adicionalmente, estos

resultados proporcionan una explicación para la resistencia intrínseca o adquirida de las células de cáncer a agentes quimioterapéuticos.

### **Isoformas de Smac**

La identificación de Smac beta, una isoforma que carece del dominio de unión a IAPs, pero que retiene la capacidad de potenciar la apoptosis, sugirió que la actividad proapoptótica de Smac se encuentra en la región carboxilo terminal (Roberts *et al.*, 2001). Por lo tanto, la actividad de Smac durante el proceso apoptótico aún no se conoce completamente.

El hallazgo de dos secuencias semejantes a Smac sugiere que es probable que algunas isoformas de esta proteína pudieran ser reguladas en forma dependiente del estímulo apoptótico. De manera interesante, una de las secuencias encontradas carece del dominio de unión a IAPs, por lo que será importante analizar su papel en la apoptosis.



## VIII. CONCLUSIONES

- La muerte celular inducida por los cuatro estímulos seleccionados fue debida a la apoptosis, como lo demuestra la inducción de la condensación nuclear, activación de caspasas y liberación de proteínas mitocondriales al citosol.
- Los estímulos apoptóticos indujeron una activación diferencial de las caspasas, lo que sugirió divergencias en la inducción del proceso apoptótico.
- Smac fue regulado a nivel de ARN mensajero y de proteína en forma diferencial, dependiendo del estímulo apoptótico.
- Durante la apoptosis inducida por deprivación de suero y por taxol se observó un incremento en los niveles del ARN mensajero de Smac y una disminución en los niveles de la proteína.
- La exposición a etopósido y a estaurosporina no indujo cambios en los niveles de ARN mensajero de Smac. Los niveles totales de proteína se mantuvieron constantes durante la apoptosis inducida por etopósido, en contraste la estaurosporina indujo la disminución de los niveles de proteína.
- La expresión de las IAPs fue regulada diferencialmente dependiendo del estímulo apoptótico.
- La exposición al etopósido indujo la regulación positiva post-transcripcional de la Survivina y de la Survivina DEx3.
- La Survivina, y en menor grado, la Survivina DEx3, regulan la liberación específica de Smac durante la apoptosis inducida por el etopósido, debido a una directa asociación de la Survivina y Smac en la mitocondria.
- La Survivina y la Survivina DEx3 incrementan la estabilidad de Smac en el citosol durante la apoptosis inducida por etopósido.

## IX. REFERENCIAS

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO Journal*, **20**:6627-6636, 2001.

Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the surviving paradigm. *Journal of Cellular Biochemistry*, **92**:656-663, 2004.

Altieri DC. Validating Survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews in Cancer*, **3**:46-54, 2003.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, **3**:917-921, 1997.

Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer*, **6**:256-, 2006.

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RC. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO Journal*, **22**:4385-4399, 2003.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **314**:902-907, 2004.

Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medical Chemistry - Anti-cancer Agents*, **5**:363-372, 2005.

Bridgham JT, Wilder JA, Hollocher H, Johnson AL. All in the family: evolutionary and functional relationships among death receptors. *Cell Death and Differentiation*, **10**:19-25, 2003.

Burri L, Strahm Y, Hawkins CJ, Gentle IE, Puryer MA, Verhagen A, Callus B, Vaux D, Lithgow T. Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Molecular Biology of the Cell*, **16**:2926-2933, 2005.

Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2a: a novel survivin splice variant expressed in malignancies. *Molecular Cancer*, **4**:11, 2005.

Chai J, Du C, Wu J, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**:855-862, 2000.

Chandra D, Choy G, Deng X, Bhatia B, Daniel P, Tang DG. Association of active caspase 8 with the mitochondrial membrane during apoptosis: potential roles in cleaving BAP31 and caspase 3 and mediating mitochondrion-endoplasmic reticulum cross talk in etoposide-induced cell death. *Molecular and Cellular Biology*, **24**:6592-6607, 2004.

Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:17593-17596, 2003.

Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: a evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **7**: 227-233, 2000.

Chiu C, Lin CMY, Fang K. Etoposide (VP-16) sensitizes p53-deficient human non-small cell lung cancer cells to caspase-7-mediated apoptosis. *Apoptosis*, **10**:643-650, 2005.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, **2**:647-656, 2002.

Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang H, Tsang BK, Cheng JQ. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry*, **279**:5405-5412, 2004.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, **116**: 205-219, 2004.

Davoodi J, Lin L, Kelly J, Linston P, MacKenzie AE. Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:40622-40628, 2004.

Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes and Development*, **16**:33-45, 2002.

Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, **13**:239-252, 1999.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial surviving inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, **114**:1117-1127, 2004.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**:33-42, 2000.

Duckett CS. IAP protein: sticking it to Smac. *Biochemical Journal*, **385**:e1-e2, 2005.

Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*, **139**:493-499, 2003.

Espinosa M, Cantu D, López CM, De la Garza JG, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors. *BMC Cancer*, **4**:84, 2004.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *Journal of Cell Science*, **115**:575-585, 2002.

Fu J, Jin Y, Arend LJ. Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:52660-52672, 2003.

Germain M, Affar E, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *Journal of Biological Chemistry*, **274**:28379-28384, 1999.

Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer KH, Lavrik IN. c-FLIP<sub>R</sub>, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **280**:14507-14513, 2005.

Gorka M, Godlewski MM, Gajkowska B, Wojewodzka U, Motyl T. Kinetics of smac/DIABLO release from mitochondria during apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cell Biology International*, **28**:741-754, 2004.

Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction*, **131**:103-111, 2006.

Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, **121**:671-674, 2005.

Hansen TM, Smith DJ, Nagley P. Smac/DIABLO is not released from mitochondria during apoptotic signalling in cells deficient in cytochrome c. *Cell Death and Differentiation*, **13**: 1181-1190, 2006.

Hao Y, Sekine K, Kawabata A, Nakamura H, Toshiyasu I, Ohata H, Katayama R, Hashimoto C, Zhang X, Noda T, Tsuruo T, Naito M. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature Cell Biology*, **6**:849-860, 2004.

Hauser H, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *The Journal of Cell Biology*, **141**:1415-1422, 1998.

Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings BA. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**:25643-25646, 2001.

Hong X, Lei L, Glas R. Tumors acquire inhibitors of apoptosis protein (IAP)-mediated apoptosis resistance through altered specificity of cytosolic proteolysis. *Journal of Experimental Medicine*, **197**:1731-1743, 2003.

Hu S, Yang X. Cellular Inhibitor of apoptosis 1 y 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:1005-10060, 2003.

Huang Y, Rich RL, Myszka DG, Wu H. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *Journal of Biological Chemistry*, **49**:49517-49522, 2003.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, **2**:277-288, 2002.

Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, Srivastava RK. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Research*, **63**:1712-1721, 2003.

Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:16547-16552, 2002.

Kim JY, Chung J, Lee SG, Kim Y, Park J, Yoo KS, Yoo YH, Park YC, Kim BG, Kim J. Nuclear interaction of smac/DIABLO with survivin at G2/M arrest prompts docetaxel-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **350**:949-954, 2007.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonnys MV, Malorni W, Knigh RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, **12**:1463-1467, 2005.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **21**:8247-8254, 2001.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**:580-584, 1998.

Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death and Differentiation*, **12**:292-303, 2005.

Lim ML, Chen B, Beart PM, Nagley P. Relative timing of redistribution of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria during apoptosis assessed by double immunocytochemistry on mammalian cells. *Experimental Cell Research*, **312**:1174-1184, 2006.

Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, Li F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:15196-15203, 2004.

Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene*, **23**:39-48, 2004.

Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, **408**:1004-1008, 2000.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**: 481-490, 1998.

Ma L, Huang Y, Song Z, Feng S, Tian X, Du W, Qiu X, Heese K, Wu M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death and Differentiation*, **13**:2079-2088, 2006.



MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:36611-36616, 2002.

Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD. Differential subcellular localization of functionally divergent surviving splice variants. *Cell Death and Differentiation*, **9**:1334-1342, 2002.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-Dex3 and Survivin 2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor surviving with different antiapoptotic properties. *Cancer Research*, **59**:6097-6102, 1999.

Maldonado V, De Anda J, Meléndez-Zajgla J. Paclitaxel-induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent. *Journal of Biochemical Toxicology*, **11**:183, 1996.

Martinez-Velazquez M, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cellular Signalling*, **19**:1212-1220, 2007.

Martinou J, Green DG. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **2**:63-67, 2001.

Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of surviving in apoptosis suppression. *EMBO Journal*, **22**:2729-2740, 2003.

McDonald ER, El-Deiry WS. Suppression of caspase-8- and -10- associated RING proteins results in sensitisation to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *PNAS*, **101**:6170-6175, 2004.

McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M, Wheatley SP, Lemoine NR. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Experimental Cell Research*, **302**:69-82, 2005.

Mendoza FJ, Henson ES, Gibson SB. MEKK1-induced apoptosis is mediated by Smac/Diablo release from mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **331**:1089-1098, 2005.

Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, Okihara K, Kawauchi A, Bonavida B, Miki T. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*, **23**:448-454, 2005.

Noton EA, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, Ferrigno PK, Wheatley SP. Molecular analysis of survivin isoforms. Evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, **281**:1286-1295, 2006.

O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villan A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34<sup>cdc2</sup> phosphorylation of survivin. *PNAS*, **97**:13103-13107, 2000.

O'Connor DS, Wall NR, Porter ACG, Altieri DC. A p34<sup>cdc2</sup> survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell*, **2**:43-54, 2002.

Okada H, Suh W, Jin J, Woo M, Du C, Elia A, Duncan GS, Wakeham A, Itie A, Lowe SW, Wang X, Mak TW. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology*, **22**:3509-3517, 2002.

Peter ME. The flip side of FLIP. *Biochemical Journal*, **382**:e1-e3, 2004.

Qiu X, Goldberg AL. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and Caspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, **280**:174-182, 2005.

Richter BWM, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, Tian L, Frank S, Youle RJ, Nelson DL, Angelo LDN, Vezzone P, Fearnhead HO, Duckett CS. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Molecular and Cellular Biology*, **21**:4292-4301, 2001.

Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *Journal of Cell Biology*, **153**:221-227, 2001.

Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *Journal of Biological Chemistry*, **275**:32438-32443, 2000.

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **3**:401-410, 2002.

Samuel T, Welsh K, Lober T, Togo SH, Zapata JM, Reed JC. Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of TRAF2 and SMAC. *Journal of Biological Chemistry*, **281**:1080-1090, 2006.

Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene*, **21**:1727-1738, 2002.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli K J, Debatin K, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO Journal*, **17**:1675-1687, 1998.

Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukai I, Fujii Y. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncology Report*, **11**:797-802, 2004.

Shi Y. Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, **9**:459-470, 2002.

Shin H, Renatus M, Eckelman BP, Nunes VA, Sampaio CAM, Salvesen GS. The BIR domain of IAP-like protein 2 is conformationally unstable: implication for caspase inhibition. *Biochemical Journal*, **385**:1-10, 2005.

Shin S, Sung B, Cho Y, Kim H, Ha N, Hwang J, Ching C, Jung Y, Oh B. An anti-apoptotic protein human surviving is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, **40**:1117-1123, 2001.

Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, Verhagen AM, Vaux DL. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *The Journal of Cell Biology*, **157**:115-124, 2002.

Silke J, Kratina T, Ekert PG, Pakusch M, Vaux DL. Unlike Diablo/smac, Grim promotes global ubiquitination and specific degradation of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and neither cause apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:4313-4321, 2004.

Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between Survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of Survivin during taxol-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:23130-23140, 2003.

Song Z, Wu M. Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. *Oncogene*, **24**:2723-2734, 2005.

Springs SL, Diavolitsis VM, Goodhouse J, McLendon GL. The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:45715-45718, 2002.

Srinivasula SM, Datta P, Fan X, Fernández-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **275**:36152-36157, 2000.

Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, Schulze-Oshto K. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene*, **20**:1193-1202, 2001.

Sun X, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *Journal of Biological Chemistry*, **277**:11345-11351, 2002.

Sunters A, Fernandez de Mattos S, Stahl M, Bronsen JJ, Zompoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RH, Lam E. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, **278**:49795-49805, 2003.

Tenzer A, Zingg D, Rocha S, Hemmings B, Fabbro D, Glanzmann C, Schubiger PA, Bodis S, Pruschy M. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway is a target for the anticancer and radiosensitizing agent PKC412, an inhibitor of protein kinase C $\beta$ . *Cancer Research*, **61**:8203-8210, 2001.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**:1456-1462, 1995.

Tirro E, Consoli ML, Massimino M, Mazella L, Frasca F, Sciacca L, Vicari L, Stassi G, Messina L, Messina A, Vigneri P. Altered expression of c-IAP1, Survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Research*, **66**:4263-4272, 2006.

Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD, Kluck RM. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **280**:2266-2274, 2005.

van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, **9**:1031-1042, 2002.

Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **6**:287-297, 2005.

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*, **2**:reviews3009.1-3009.10, 2001.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakush M, Silke J, Conolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**:43-53, 2000.

Vogler M, Giagkousiklidis S, Genze F, Gschwend JE, Debatini K, Fulda S. Inhibition of clonogenic tumor growth: a novel function of Smac contributing to its antitumor activity. *Oncogene*, **24**:1-13, 2005.

Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro MT, Kadkhodayan S, Fairbrother WJ, Dixit VM. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma

inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Journal of Biological Chemistry*, **277**:12275-12279, 2002.

Vucic D, Franklin MC, Wallweber HJA, Das K, Eckelman BP, Shin H, Elliot LO, Kadkhodayan S, Deshayes K, Salvesen GS, Fairbrother J. Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochemical Journal*, **385**:11-20, 2005.

Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of surviving phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Research*, **63**:230-235, 2003.

Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus which resembles a spliced variant of human surviving. *EMBO Journal*, **21**:2602-2615, 2002.

Wel J, Sun Z, Chen Q, Gu J. Serum deprivation induced apoptosis in macrophage is mediated by autocrine secretion of type I IFNs. *Apoptosis*, **11**:545-54, 2006.

Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS. Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:51082-51090, 2004.

Winkler D, Schneider C, Kröber A, Pasqualucci L, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Leukemia*, **19**:1211-1215, 2005.

Wu G, Chai J, Suber TL, Wu J, Du C, Wang W, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, **408**:1008-1012, 2000.

Yang Q, Du C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and Livin in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:16963-16970, 2004.

Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, Park WS, Jeon HM, Jung ES, Lee JY, Lee SH. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS*, **111**:382-388, 2003.

Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K. IFN $\gamma$  induces the apoptosis of WEHI 279 and normal pre-B cell lines by expressing direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pl. *The Journal of Immunology*, **167**:2487-2495, 2001.

Zhang XD, Zhang XY, Gray CP, Nguyen T, Hersey P. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by Smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Research*, **61**:7339-7348, 2001.

Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, **3**:187-197, 2004.

Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates surviving degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science*, **113**:4363-4371, 2000.

Zhou LL, Zhou LY, Luo KQ, Chang DC. Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis. *Apoptosis*, **10**:289-299, 2005.



## ANEXO 1

### ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMPC	Adenosin monofosfato ciclico
ANT	Translocasa de nucleotidos adenina
Apaf-1	Factor 1 activador de caspasa apoptotica
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl-2	Leucemia de células B-2
BIR	Repetición IAP baculoviral
BRUCE/BIRC6	Enzima conjugadora de ubiquitina que contiene una repetición BIR/ Proteína que contiene BIR 6
CARD	Dominio de reclutamiento para caspasas
CARPs	Proteínas RING, asociadas a las caspasas 8 y 10
Cdc2	Cinasa dependiente de ciclina 2
CDE/CHR	Elemento dependiente del ciclo celular/región de homología a genes del ciclo celular
c-FLIP	Proteína inhibidora de FLICE celular
ciAP-1/BIRC2	IAP celular 1/ proteína que contiene BIR 1
ciAP-2/BIRC3	IAP celular 2/ proteína que contiene BIR 2
DNA-PK	Proteína cinasa dependiente de DNA
FADD	Proteína asociada a Fas vía dominio de muerte
HBXIP	Proteína que interactúa con la proteína X de la hepatitis B
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IFN $\gamma$	Interferón gama
ILP-2/BIRC8	Proteína 2 tipo IAP/ proteína que contiene BIR 8
INCENP	Proteína interna del centrómero
JNK	Cinasa amino terminal de c-Jun
MEKK1	Cinasa 1 de MEK

ML-IAP/BIRC7	IAP de Melanoma/ proteína que contiene BIR 7
NAIP/BIRC1	IAP Neuronal/ proteína que contiene BIR 1
Omi/HtrA2	Proteína A2 que requiere alta temperatura
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
RING	Nuevo gen realmente interesante
Smac/Diablo	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo punto isoeléctrico
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral
UBC	Conjugadora de ubiquitina
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
XIAP/BIRC4	Inhibidor de apoptosis unido al cromosoma X

#### **ABREVIATURAS DE MEDIDAS.**

H	Horas
kDa	Kilodaltones
Min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Nm	Nanometros
Pb	Pares de bases
pM	Picomolar
Rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

## ANEXO 2

### MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ESTÍMULOS APOPTÓTICOS

#### **Ausencia de suero.**

La apoptosis mitocondrial puede ser inhibida a diferentes niveles. Una forma de inhibición es a través de señales de supervivencia mediadas por los factores de crecimiento y citocinas, que activan la vía de PI3K. PI3K activa a AKT, el cual fosforila e inactiva al miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2, Bad. Bad fosforilado es secuestrado por las proteínas 14-3-3 en el citosol, evitando de esta manera que actúe en la mitocondria para permitir la salida de proteínas proapoptóticas (Igney y Krammer 2002; Cory y Adams 2002).

#### **Taxol.**

El Taxol es un agente antineoplásico efectivo en el tratamiento del cáncer de mama, ovario y pulmón. El Taxol induce la estabilización de microtúbulos y arresto del ciclo celular en G2/M, conduciendo así a la muerte celular. Sin embargo, la vía de muerte inducida por el taxol no está bien definida, aunque se ha propuesto que la familia de proteínas de Bcl-2 tiene un papel importante. Un miembro proapoptótico de esta familia, Bim, se localiza en los microtúbulos por medio de su unión al motor dineína. Después de activación por fosforilación, Bim se disocia de los microtúbulos y se une a Bcl-2 y Bcl-xL, secuestrando así a Bcl-2 de Bax y Bad, los cuales quedan entonces libres para iniciar la cascada apoptótica. Se ha reportado que el tratamiento con Taxol induce transcripcionalmente la expresión de Bim, que es importante para la sensibilidad a la apoptosis inducida por taxol (Sunters *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005).

### **Etopósido.**

El etopósido es un importante agente antineoplásico utilizado para el tratamiento de una amplia gama de tumores. El blanco principal del etopósido es la topoisomerasa II. Esta enzima remueve el sobreenrollamiento del genoma al introducir cortes transitorios en la doble hebra del ADN. El etopósido estabiliza al complejo covalente enzima-ADN cortado que es un intermediario en el ciclo catalítico de la topoisomerasa II. La acumulación de estos complejos de corte en células tratadas conduce a la generación de cortes permanentes en el material genómico, lo cual dispara las vías de recombinación/replicación, mutagénesis y translocaciones cromosomales. Si los cortes permanecen la célula puede iniciar las vías de muerte (Baldwin y Osheroff, 2005). En este caso, el daño al ADN activa a la proteína DNA-PK, que a su vez fosforila y activa a p53. La fosforilación de p53 resulta en la regulación positiva de proteínas implicadas en el control del ciclo celular y la apoptosis. En particular, Bax es una proteína proapoptótica que es transcripcionalmente regulada por p53, que entonces incrementa sus niveles y se transloca a la mitocondria para inducir la salida de citocromo c al citosol (Karpinich *et al.*, 2002).

### **Estaurosporina.**

La estaurosporina es un potente inhibidor de proteínas cinasa. Ha sido ampliamente utilizado *in vitro* como un inductor de apoptosis en muchas líneas celulares. Sin embargo, los mecanismos por los cuales induce apoptosis aún no se conocen con exactitud. Se ha sugerido que la vía intrínseca tiene un papel importante en la apoptosis inducida por estaurosporina. Se ha reportado el requerimiento de activación de caspasas para la muerte inducida por estaurosporina, pero también se han sugerido mecanismos independientes de caspasas. La vía dependiente de caspasas se asocia a la activación de Bax y liberación de Smac y citocromo c, mientras que en la vía independiente de caspasas podría estar involucrado AIF (Zhang *et al.*, 2004).

## ANEXO 3

### ISOFORMAS DE SMAC

#### *Smac fi.*

A partir de la clonación del producto de PCR de Smac beta se identificó una clona que expresaba una secuencia de menor tamaño (423 pb). Esta clona fue amplificada y secuenciada. La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia de smac. La nueva secuencia posee un amino terminal similar al de smac beta, pero carece del exón 4 (Figura 24). La posible isoforma se denominó Smac fi.

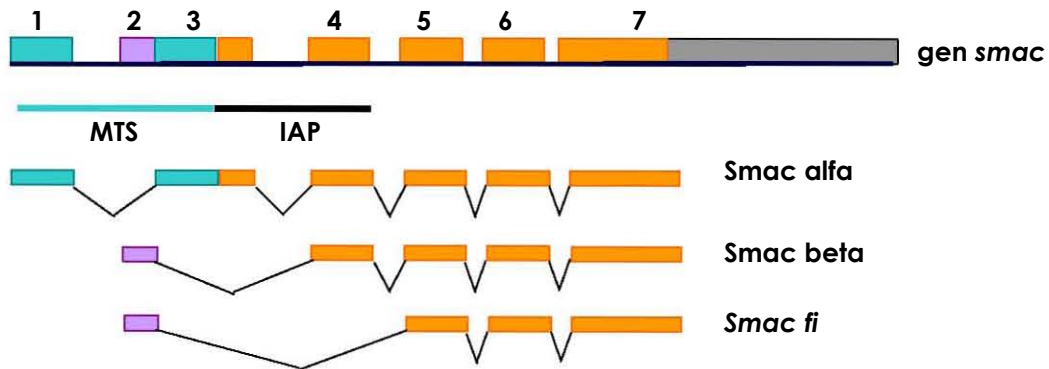


Figura 24. Alineación de las secuencias.

La secuencia fue clonada en un vector viral (pLXSN) y en un vector con una bandera de 6 histidinas (pHM6) en el marco de lectura de Smac. La bandera se localiza en el extremo carboxilo terminal.

La secuencia de smac fi y de la proteína que codifica se muestran a continuación. Debido a la semejanza de la proteína con Smac beta, se piensa que pudiera tener la misma distribución subcelular citosólica.

1 atgaaatctgctcttccaggctgtttatccttaacttctctttac  
M K S A L P G C L S L T S L Y  
46 cgacaatatacaagtttacttgggaaaatgaattcagaggaggaa  
R Q Y T S L L G K M N S E E E  
91 gatgaagtgtggcaggtgatcataggagccagagctgagatgact  
D E V W Q V I I G A R A E M T  
136 tcaaaacaccaagagtacttgaagctggaaaccacttggatgact  
S K H Q E Y L K L E T T W M T  
181 gcagttggtctttcagagatggcagcagaagctgcatatcaaact  
A V G L S E M A A E A A Y Q T  
226 ggcgcagatcaggcctctataaccgccaggaatcacattcagctg  
G A D Q A S I T A R N H I Q L  
271 gtgaaactgcaggtggaagaggtgcaccagctctcccggaaagca  
V K L Q V E E V H Q L S R K A  
316 gaaaccaagctggcagaagcgcagatagaagagctccgtcagaaa  
E T K L A E A Q I E E L R Q K  
361 acacagggggaaggggaggagcgggctgagtcggagcaggaggcc  
T Q G E G E E R A E S E Q E A  
406 tacctgcgtgaggattga 423  
Y L R E D \*

### **Smac *épsilon*.**

A partir de la clonación del producto de PCR de Smac alfa se obtuvo una secuencia de mayor tamaño (826 pb). La alineación del producto secuenciado con la secuencia del gen smac se observa en la Figura 25. A esta isoforma se le llamó smac *épsilon*.

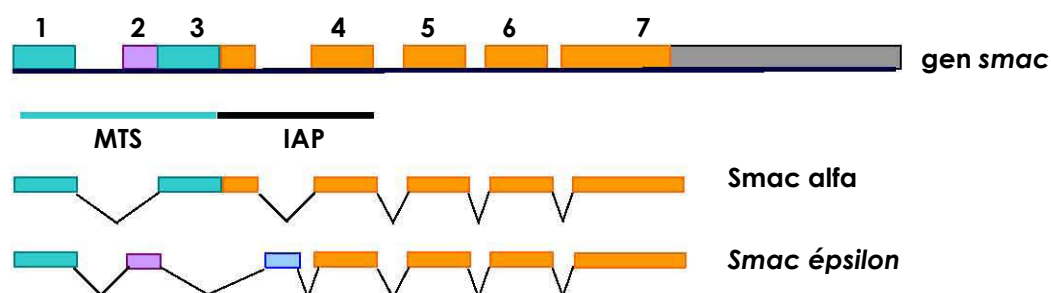


Figura 25. Alineación de las secuencias. El cuadro azul representa un nuevo exón que se encuentra dentro del intrón entre los exones 3 y 4 del gen de smac.

Las secuencias adyacentes al nuevo exón de smac *épsilon* cumplen con los requisitos necesarios para llevar a cabo el splicing (las secuencias consenso cortas en los sitios 5' y 3' del splicing, y el sitio de unión).

La secuencia de smac *épsilon* se muestra a continuación.

```
1  atggcgggctctgaagagttggctgtcgcgcagcgttaacttcattc
46  ttcagggtcctgcttggctcgagtttgagtttacagccccctgcaa
91  gtaaataccaagagcctgttacagattggcggctcgtgccttatgaa
136 atctgacttctacttccaggaacagcacatcaaattgtataaagc
181 gagcagagagaaataagaggatattacagtctatcaacaaagtag
226 tctttgattcaacagaaatttattgagcaacttttatgtgcaaga
271 cactgagaataaatcagagcctcattcccttagtagtgaagcatt
316 gatgaggagagcagtgctctttggtaacagatagcacctctacctt
361 tctctctcagaccacatatgcgcttgattgaagctattactgaata
```

406 tactaaggctggtttataccttaacttctctttaccgacaataac  
 451 aagtttacttgggaaaatgaattcagaggaggaagatgaagtgtg  
 496 gcaggtgatcataggagccagagctgagatgacttcaaaacacca  
 541 agagtacttgaagctggaaaccacttggatgactgcagttggtct  
 586 ttcagagatggcagcggaaagctgcatatcaaactggcgcagatca  
 631 ggctctataaccgccaggaatcacattcagctggtgaaactgca  
 676 ggtggaagaggtgcaccagctctcccggaaagcagaaccaagctg  
 721 gcagaagcacagatagaagagctccgtcagaaaacacaggaggaa  
 766 ggggaggancggnctgantcggaacangaggcctacctgcgtgag  
 821 gattga 826

La traducción de la secuencia produciría tres péptidos y una proteína de mayor tamaño. La proteína es semejante a una proteína recombinante de Smac, Smac $\Delta$ 75, la cual carece de la secuencia de localización mitocondrial y de 20 aminoácidos donde se encuentra el dominio de unión a las IAPs. Esta proteína recombinante fue capaz de inducir apoptosis, a pesar de que no interactúa con las IAPs (Roberts *et al.*, 2001).

- Péptido 1  
MAALKSWLSRSVTSFFRFLLGSSLSLQPLQVNPRACYRLAVVPYEI \*
- Péptido 2  
MKSDFYFQEQHIKLYKASREK \*
- Péptido 3  
MCKTLRINQSLIPLVVKH \*
- Proteína  
MRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLTSLYRQYT  
SLLGKMNSEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGL  
SEMAAEAAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAEPSW  
QKHR \*

La secuencia fue clonada en un vector viral (pLXSN) y en un vector con una bandera de 6 histidinas (pHM6) en el marco de lectura de Smac. La bandera se localiza en el extremo carboxilo terminal.



**ANEXO 4**

**ARTÍCULO**

## ORIGINAL ARTICLE

## Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin

G Ceballos-Cancino, M Espinosa, V Maldonado and J Melendez-Zajgla

*Molecular Biology Laboratory, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, Mexico City, Mexico*

**The intrinsic apoptotic pathway is characterized by the release of several mitochondrial intermembrane proteins into the cytosol of dying cells. It is unclear whether the release of these proteins follows a common or specific pathway. In the present report we show that survivin and, to a lesser extent, the survivin splice variant survivin DeltaEx3 regulate the specific liberation of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI (Smac/DIABLO), an inhibitor of apoptosis proteins binding protein, during apoptosis induced by etoposide, a DNA damaging agent. This anti-neoplastic drug induced posttranscriptional upregulation of survivin and survivin DeltaEx3. In turn, mitochondrial survivin associated with Smac/DIABLO, delaying its release. In addition, cytosolic survivin also stabilized the cytosolic levels of released Smac/DIABLO. These results provide an explanation for the observed differences in the release of mitochondrial intermembrane proteins in various apoptotic models and present a new mechanism for the anti-apoptotic effects of survivin in cancer cells.**

*Oncogene* advance online publication, 4 June 2007; doi:10.1038/sj.onc.1210560

**Keywords:** antineoplastic drugs; cancer; DNA damage; inhibitor of apoptosis proteins; mitochondria

## Introduction

Apoptosis is a highly conserved cell suicide program essential for development and homeostasis of all metazoan organisms. One of the main routes to cell death is the mitochondrial or intrinsic pathway, mediated by the release of cytochrome *c* into the cytosol. Cytochrome *c* then binds to Apaf-1 and activates caspase 9, which in turn activates the effector caspases 3, 6 and 7. The cascade activation of caspases is strictly regulated, both positively and negatively. Members of the inhibitor of apoptosis proteins (IAP) family, which includes

NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin, ML-IAP and BRUCE, bind to caspases and neutralize their activity. In turn, second mitochondria-derived activator of caspase (Smac), also known as direct IAP binding protein with low pI (DIABLO), binds and neutralizes IAPs, restoring caspase activity (Verhagen and Vaux, 2002). After an apoptotic stimulus, Smac/DIABLO is released into the cytosol where it neutralizes IAPs and potentiates apoptosis (Du *et al.*, 2000). In addition, the interaction between Smac/DIABLO and IAPs induces the proteasomal degradation of the former, due to the E3 ubiquitin protease ligase activity of the RING domain of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP (Morizane *et al.*, 2005).

Although it is known that Smac/DIABLO is controlled by the Bcl-2 family of proteins (Yamaguchi *et al.*, 2003) and mitogen-activated protein kinase family members such as Erk1/2 (Zhang *et al.*, 2003) and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (Chauhan *et al.*, 2003), the precise mechanism and kinetics for release of Smac/DIABLO from the mitochondria remain unclear. It has been reported both that Smac/DIABLO is released independently of cytochrome *c* (Deng *et al.*, 2002) and simultaneously with it (Zhou *et al.*, 2005). This discrepancy might be the result of different mechanisms of release after a specific stimulus that eventually converge, as suggested by the requirement of caspase activity for Smac/DIABLO release but not for cytochrome *c* release (Adrain *et al.*, 2001). Alternatively, the release mechanism may be common, but additional input signals might retain Smac/DIABLO or cytochrome *c* specifically in the mitochondria. Here we report that survivin mediates a mitochondrial signal that prevents Smac/DIABLO release from mitochondria.

## Results

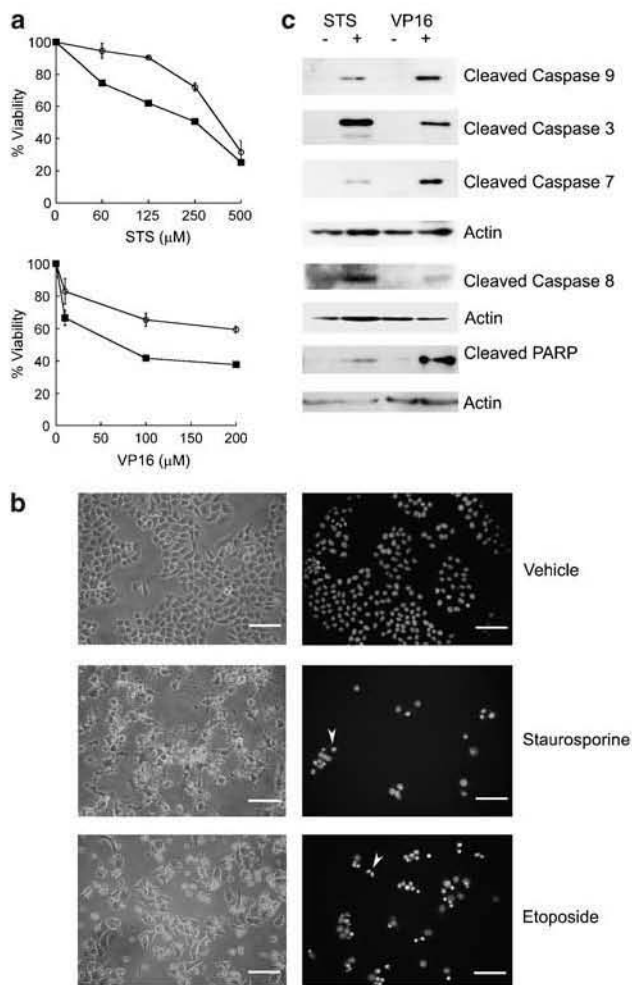
*Induction of apoptosis in HeLa cells by etoposide or staurosporine*

To gain more insight into the regulation of cytochrome *c* and Smac/DIABLO release, we chose two different cell death stimuli that engage the intrinsic pathway: a DNA damaging agent, etoposide, and a drug that induces cellular stress, staurosporine. As shown in Figure 1, cell death induced by these drugs was due to apoptosis, as both drugs induced typical apoptotic morphology with appreciable cytoplasmic condensation and nuclear

Correspondence: Dr V Maldonado or Dr J Melendez-Zajgla, Molecular Biology Laboratory, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando 22, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico.

E-mail: vilmaml@gmail.com or jorgezajgla@salud.gob.mx

Received 17 October 2006; revised 12 March 2007; accepted 23 April 2007

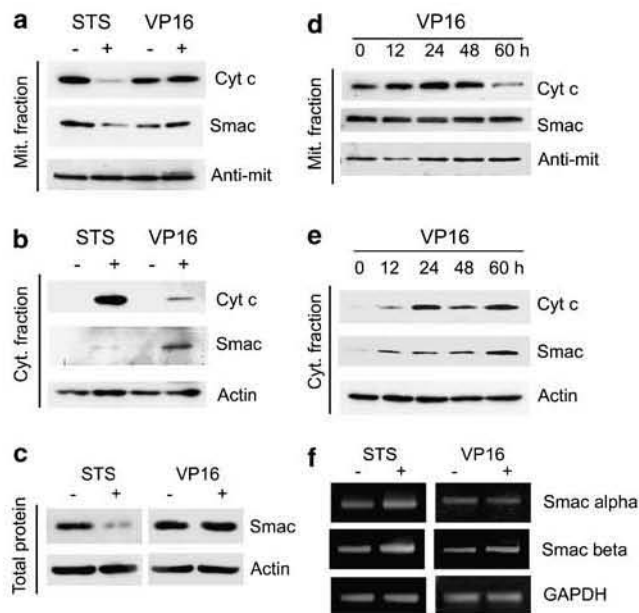


**Figure 1** Staurosporine and etoposide induce apoptosis in cancer cells. (a) Viability of HeLa cells cultured for 12 (open circles) or 24 h (closed squares) in the presence of the indicated concentrations of staurosporine (upper panel) or to etoposide (lower panel) for 24 (open circles) or 48 h (closed squares). (b) Cellular and nuclear morphology of HeLa cells exposed to the indicated stimuli. Condensed and fragmented nuclei are indicated by arrowheads. Left panels: phase contrast. Right panels: fluorescence (bar = 30  $\mu\text{m}$ ). (c) Caspase activation analysed by western blot during apoptosis induced by staurosporine or etoposide. An antibody against actin was used as a loading control. Staurosporine, STS; etoposide, VP16.

fragmentation. Figure 1c shows that more caspase 9 and 7 were processed after exposure to etoposide than after exposure to staurosporine. In contrast, higher amounts of caspases 8 and 3 were cleaved after staurosporine exposure. The relative amount of caspase 7 cleavage by the two stimuli was reflected in the amount of fragmented poly-(ADP-ribose)polymerase protein, a substrate for this enzyme (Figure 1c).

#### DNA damage and cell stress induce differential release of Smac/DIABLO and cytochrome *c*

The differences in caspase processing following etoposide or staurosporine exposure suggested a divergence in



**Figure 2** DNA damage and cell stress induce differential release of Smac/DIABLO and cytochrome *c*. HeLa cells were exposed to the LD<sub>50</sub> of the indicated drugs and subcellular fractions were prepared for western blot analysis. (a) Mitochondrial extracts. (b) Cytosolic extracts. (c) Total protein. Temporal course of Smac/DIABLO and cytochrome *c* release from mitochondria in cells exposed to etoposide. (d) Mitochondrial extracts. (e) Cytosolic extracts. (f) Steady-state Smac  $\alpha$ - and  $\beta$ -mRNA levels were analysed by RT-PCR in cells exposed to the LD<sub>50</sub> of staurosporine and etoposide. Fractions: Cyt, cytosolic; Mit, mitochondrial.

the activation of the intrinsic apoptotic pathway. To assess this possibility, we analysed the release of Smac/DIABLO and cytochrome *c* after exposure to etoposide or staurosporine. Even when the LD<sub>50</sub> was used for each drug, less cytochrome *c* and Smac/DIABLO was released in cells exposed to etoposide (Figure 2a). It is important to note that even when a larger amount of Smac/DIABLO was released from the mitochondria in response to staurosporine, its cytosolic level did not increase (Figure 2b), possibly due to rapid cytosolic degradation, as reported elsewhere (MacFarlane *et al.*, 2002). This was supported by the clear downregulation of total Smac/DIABLO protein level in staurosporine-treated cells (Figure 2c), and its prevention by the proteasome inhibitor MG132 (Supplementary Figure 1). In contrast, etoposide-treated cells presented higher cytosolic levels of Smac/DIABLO, even when no evident decrease of mitochondrial protein was found, suggesting the presence of a stabilization mechanism (Figure 2a and b). A temporal course of etoposide exposure showed that most of the cytochrome *c* was released by 60 h, whereas very little Smac/DIABLO was released at this time (Figure 2d and e). To eliminate the possibility that a transcriptional mechanism could explain these data, we analysed the Smac/DIABLO mRNA levels. As shown in Figure 2f, mRNA levels of the major Smac/DIABLO isoforms remained constant during exposure to etoposide, whereas a small increase was observed after exposure to staurosporine.

*The defective release of Smac/DIABLO during etoposide-induced apoptosis is not due to modulation by Bcl-2 family members or caspase signaling*

It has been shown that etoposide exposure of cancer cells induces the accumulation of Bax in mitochondria, causing the release of cytochrome *c* and cell death (Karpinich *et al.*, 2002). In our model, Bax accumulated in mitochondria as early as 12h after exposure (Figure 3a). In addition, etoposide induced a decrease in mitochondrial Bcl-2, most noticeable at 24h after exposure (Supplementary Figure 2). It has been previously shown that etoposide induces a positive feedback mechanism involving active caspases and mitochondria. To assess whether this mechanism could be impaired in our model, we analysed the cleavage of caspases 8, 9 and 3 in cells exposed to etoposide. As shown in Figure 3b, caspases 9 and 3 were cleaved 24h after exposure to the drug, in accordance with Bax translocation. These results showed that caspases were activated after Bax translocation to mitochondria and remained active during apoptosis induced by etoposide. When Bcl-2 expression was inhibited by means of antisense expression (Figure 3c), Smac/DIABLO release from mitochondria after exposure to the LD<sub>50</sub> of etoposide for 48h was not enhanced, despite the fact that a larger amount of cytochrome *c* was found in cytosol and a higher decrease in cell viability was induced (Figure 3d and e). Thus, our results did not

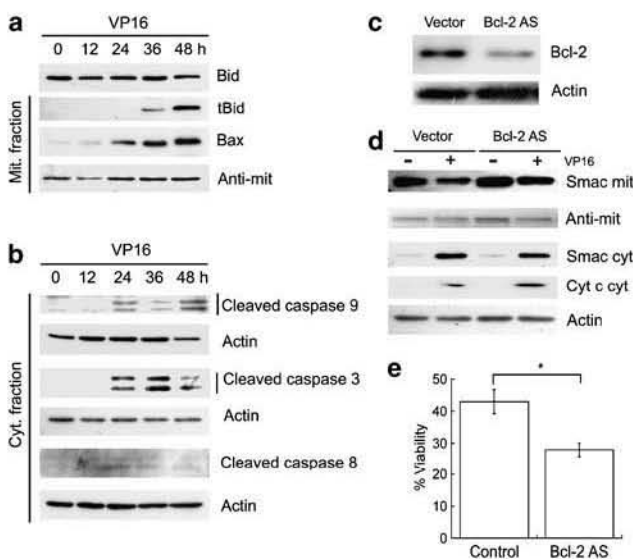
support a participation of Bcl-2 family members in the delay of Smac/DIABLO release after DNA damage.

*IAPs are differentially regulated by cellular stress and DNA damage*

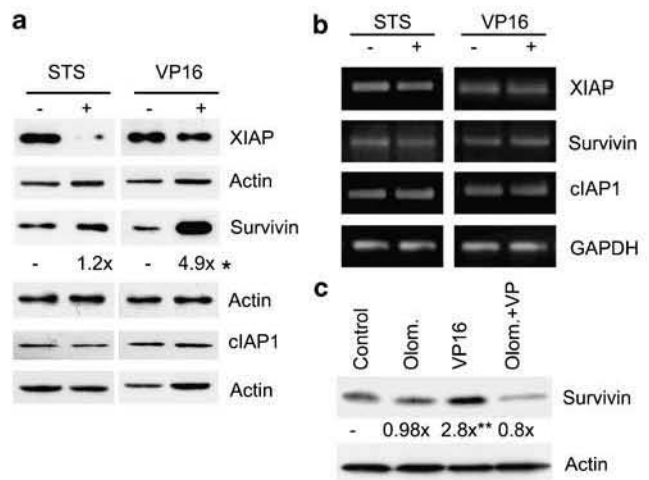
When analysed, none of the detectable IAPs in HeLa cells were downregulated after DNA damage, as opposed to a clear downregulation of XIAP in cells exposed to staurosporine (Figure 4a). Interestingly, an increase in survivin was noted in cells exposed to etoposide. These changes were not due to modulation of their mRNA levels, as demonstrated by reverse transcription (RT)-PCR analysis (Figure 4b). It has been previously shown that survivin protein is stabilized by phosphorylation of Thr34 by p34(cdc2) (O'Connor *et al.*, 2002). To ascertain if p34(cdc2) was indeed responsible for the increase in survivin expression, we exposed etoposide-treated cells to olomoucine, a pharmacological inhibitor of this kinase. Figure 4c shows that this inhibitor prevented the upregulation of survivin after etoposide exposure, supporting this scenario.

*Survivin is responsible for the delayed release of Smac/DIABLO and increased cytosolic stability of Smac/DIABLO in apoptosis induced by DNA damage*

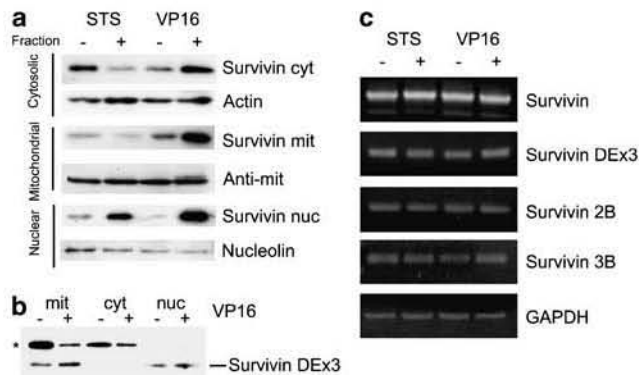
Because exposure to etoposide induced a clear and specific upregulation of survivin, we sought to analyse if



**Figure 3** Smac/DIABLO-deficient release during apoptosis induced by etoposide is not due to modulation by Bcl-2 family members or caspase signaling. HeLa cells were exposed to the LD<sub>50</sub> of etoposide and harvested at the indicated time points. (a) Mitochondrial extracts were immunoblotted with the indicated antibodies. (b) Cytosolic extracts were probed with antibodies directed against caspases 9, 3 and 8. (c) HeLa cells were stably transfected with a plasmid containing Bcl-2 in the antisense orientation (Bcl-2 AS) and the level of total Bcl-2 protein assessed. (d) HeLa cells were exposed to the LD<sub>50</sub> of etoposide. Mitochondrial (mit) and cytosolic (cyt) fractions were immunoblotted with the indicated antibodies or (e) cell viability was assessed by the crystal violet assay. Bars represent standard deviation, \* $P=0.021$ .

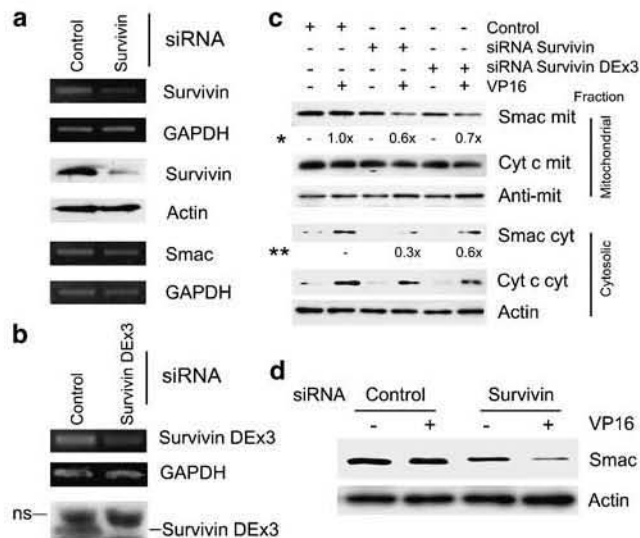


**Figure 4** IAP expression in cells exposed to staurosporine and etoposide. HeLa cells were harvested after exposure to the LD<sub>50</sub> of staurosporine and etoposide. (a) Total proteins were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. \*Normalized results from densitometric analyses are shown below the blot. Significant differences were found only in cells exposed to etoposide ( $P<0.05$ ) (b) Steady-state XIAP, survivin and cIAP1 mRNA levels from the same cells were analysed by RT-PCR. GAPDH was used as a loading control. (c) Effect of olomoucine on survivin expression after etoposide exposure. Cells were exposed to etoposide, olomoucine or both for 14h and total protein was analysed for survivin expression by western blot. Olomoucine, Olom. Significant differences were found only in cells exposed to etoposide \*\* $P=0.016$ .



**Figure 5** Survivin and survivin DeltaEx3 proteins are upregulated after etoposide exposure. HeLa cells were exposed to the LD<sub>50</sub> of etoposide or staurosporine. (a) Cells were subjected to subcellular fractionation. Cytosolic (cyt), mitochondrial (mit) and nuclear (nuc) fractions were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-survivin. Antibodies against actin, mitochondria (anti-mit) and nucleolin were used as loading controls. (b) HeLa cells exposed to etoposide were harvested and subjected to subcellular fractionation. Cytosolic, mitochondrial and nuclear fractions were subjected to immunoblotting with anti-survivin DeltaEx3 (survivin DEX3). \*, non-specific band (c) RT-PCR analyses of survivin DeltaEx3, 2B and 3B isoforms from HeLa cells exposed to etoposide and staurosporine for 24 and 48 h, respectively. GAPDH was used as a loading control.

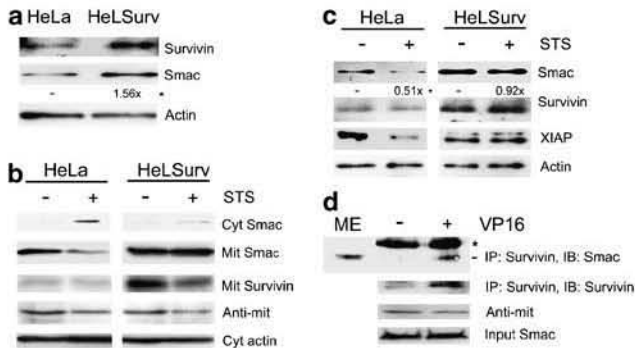
this protein could be responsible for the drug's effects on Smac/DIABLO. Figure 5a shows that etoposide induced the upregulation of cytosolic, nuclear and mitochondrial survivin, as opposed to staurosporine, which showed only a redistribution of survivin to the nucleus. We found a smaller increase in mitochondrial and nuclear abundance of survivin DeltaEx3 (Figure 5b). Survivin 2B protein was undetectable in HeLa cells (data not shown). mRNA levels for all of the described survivin isoforms were not altered (Figure 5c). These results demonstrate that the increase in survivin expression after DNA damage induced by etoposide was due to the stabilization of protein. To evaluate whether this survivin upregulation could be associated with the delayed release and stabilization of Smac/DIABLO, we used interference RNA to downregulate survivin and survivin DeltaEx3. As shown in Figure 6a and b, this approach was highly effective in reducing both survivin isoforms. When cells with reduced survivin levels were exposed to etoposide, a larger release of Smac/DIABLO from mitochondria was found, as assessed by the decrease in mitochondrial Smac/DIABLO protein (Figure 6c). In addition, lower Smac/DIABLO protein levels were found in the cytosol of cells when survivin was downregulated. In agreement with this, a decrease in total Smac/DIABLO and XIAP proteins was observed after etoposide exposure in cells depleted of survivin (Figure 6d and Supplementary Figure 3). This decrease was not due to Smac/DIABLO mRNA downregulation, as shown in Figure 6a. As expected, downregulation of survivin or DeltaEx3 isoform sensitized HeLa cells to the effects of etoposide, but not to staurosporine (Supplementary Figure 4). Similar results were found in these cells after exposure to paclitaxel, a



**Figure 6** Survivin inhibition during exposure to etoposide enhances the release of Smac/DIABLO from mitochondria and decreases its cytosolic stabilization. HeLa cells were transfected with an expression plasmid containing sequences to produce survivin- or survivin DeltaEx3-specific small interfering RNAs (siRNAs), or with a vector expressing a control siRNA. Survivin-specific (a) and survivin DeltaEx3 (survivin DEX3)-specific (b) inhibition were assessed by RT-PCR and western blotting. GAPDH was used as a loading control. (c) HeLa cells transfected with the respective siRNA vectors were exposed to etoposide for 48 h, and subjected to subcellular fractionation. Control: vector containing a scrambled survivin sequence. Mitochondrial (mit) and cytosolic (cyt) fractions were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with the indicated antibodies. \*Densitometric analysis showed significant differences ( $P < 0.05$ ) in cells transfected with survivin and survivin DEX3 siRNAs after exposure to etoposide (\*\*, \*) (d) HeLa cells transfected with survivin siRNA were exposed to etoposide for 48 h and total proteins were obtained and probed with anti-Smac/DIABLO.

drug that induces the association of survivin and Smac/DIABLO (Supplementary Figure 5) (Song *et al.*, 2003). These results showed that survivin and, to a lesser extent, survivin DeltaEx3 are able to delay Smac/DIABLO release from mitochondria after apoptosis induced by a genotoxic stimulus. In addition, both survivin isoforms stabilized Smac/DIABLO in the cytosol after its release.

To further support these results, we used the opposite approach, that is, increasing survivin in cells undergoing apoptosis induced by cellular stress. To achieve this, we created a stable cell line that overexpresses survivin (Figure 7a). In these cells, the release of Smac/DIABLO following staurosporine exposure was inhibited (Figure 7b), even considering the decrease in mitochondrial survivin levels observed after staurosporine exposure. Similarly, overexpression of survivin prevented the decrease in total Smac/DIABLO protein after staurosporine exposure (Figure 7c). As expected, XIAP levels were maintained after staurosporine exposure when survivin was overexpressed, similar to cells exposed to etoposide (Figure 4a). In accordance, survivin overexpression protected HeLa cells from staurosporine and blocked caspase 3 activation (Supplementary Figure 6).



**Figure 7** Survivin overexpression during staurosporine exposure delays Smac/DIABLO release from mitochondria. HeLa cells were stably transfected with either an empty vector, pQCXIP (HeLa), or a survivin expression plasmid, pQCXIP-Surv (HeLSurv). (a) Total proteins were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. \*Densitometric analyses showed a significant increase of Smac/DIABLO expression in HeLSurv cells (\* $P < 0.05$ ). (b) Cells were exposed to staurosporine for 24 h and subjected to subcellular fractionation. Cytosolic (cyt) and mitochondrial (mit) fractions were subjected to western blot assays with the indicated antibodies. (c) Total proteins from the same cells were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. Densitometric analyses showed significant differences in HeLa cells transfected with an empty vector ( $P < 0.05$ ), \*. (d) HeLa cells were exposed to etoposide for 48 h and subcellular fractions prepared. Survivin was immunoprecipitated (IP) and subjected to immunoblotting (IB) with an antibody against Smac/DIABLO. ME, mitochondrial extract: one-tenth of the mitochondrial extracts was immunoblotted with an anti-survivin antibody as a control to demonstrate the relative migration of survivin. Bottom panel: one-tenth of the mitochondrial extract was blotted against Smac/DIABLO to show input protein. \*Immunoglobulin light chain. Longer exposure showed a small amount of Smac/DIABLO in untreated cells.

#### Smac/DIABLO binds to mitochondrial survivin

Finally, we sought to investigate a direct association between mitochondrial Smac/DIABLO and survivin. Co-immunoprecipitation assays confirmed this, and as expected, showed that this association was increased after exposure to etoposide (Figure 7d).

#### Discussion

Recently, it has been shown that the release of cytochrome *c* and Smac/DIABLO from mitochondria after apoptotic stimuli can be regulated individually. For example, Kandasamy *et al.* (2003) showed that after tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exposure, Bid(-/-), Bax(-/-) or Bak(-/-) murine embryonic fibroblasts release cytochrome *c*, but not Smac/DIABLO. In contrast to this finding, other researchers have found that specific stimuli, such as ultraviolet light, can induce the concurrent release of cytochrome *c* and Smac/DIABLO (Zhou *et al.*, 2005). Thus, there is not yet a clear understanding of the molecular mechanism(s) for the release of these proteins.

To study the mechanism for mitochondrial intermembrane Smac/DIABLO release, we employed two apoptotic stimuli that engage the intrinsic apoptotic pathway

but differ in their molecular targets. Our results showed that, although these stimuli activated the intrinsic pathway, a clear difference was found in the kinetics of Smac/DIABLO release and activation of downstream caspases. Cells exposed to etoposide presented a delayed release of this apoptotic protein when compared with those exposed to staurosporine. When we analysed the expression levels of IAPs, we found that HeLa cells exposed to etoposide presented a specific upregulation of survivin and its isoforms due to stabilization of the proteins. Similar survivin posttranslational upregulation has been found in cancer cells exposed to diverse antineoplastic agents, such as adriamycin and paclitaxel (Wall *et al.*, 2003), suggesting that this change in survivin expression could be a possible general effect of these drugs. Previous reports have demonstrated that survivin protein stabilization is induced by phosphorylation by p34(cdc2) (Wall *et al.*, 2003). Although we did not test whether survivin was phosphorylated by this kinase, exposure to olomoucine, a pharmacological inhibitor of p34(cdc2), prevented the upregulation of survivin during etoposide exposure, supporting the participation of this kinase in our model. The increase of survivin and, to a lesser extent, survivin DeltaEx3 was responsible for the delay in Smac/DIABLO release, as shown by RNA interference assays in etoposide-treated cells and survivin overexpression studies in cells exposed to staurosporine. The delayed release of Smac/DIABLO from mitochondria may be mediated by a direct union of Smac/DIABLO to mitochondrial survivin, as demonstrated by a coimmunoprecipitation assay. Survivin could be impairing the release of Smac/DIABLO by a simple size-exclusion mechanism. Previous reports have shown that survivin and cytosolic Smac/DIABLO interact during apoptosis induced by paclitaxel (Song *et al.*, 2003), showing that this interaction is also present in other subcellular compartments (McNeish *et al.*, 2005).

These results also provide an explanation for the reported contradictory results showing either a concurrent (Zhou *et al.*, 2005) or independent (Lim *et al.*, 2006) release of cytochrome *c* and Smac/DIABLO during apoptosis. Stimuli that induce an upregulation of survivin should block or delay the release of Smac/DIABLO, even in the presence of an outer membrane permeability transition that would otherwise allow its release. Additional support to this explanation comes with our results showing an increased release of cytochrome *c* but not Smac/DIABLO in cells with depleted Bcl-2 (Figure 3d).

Both the delayed release of mitochondrial Smac/DIABLO and the blockage of cytosolic Smac/DIABLO induced by the upregulation of survivin should decrease the sensitivity of cancer cells to apoptosis and thus provide a possible mechanism for drug resistance. In support of this, it has been shown that resistance to paclitaxel in thyroid cancer cells is associated with increased survivin and reduced release of Smac/DIABLO from the mitochondria (Tirro *et al.*, 2006). Because several antineoplastic agents induce the upregulation of survivin (Ling *et al.*, 2004; Wall *et al.*, 2003), it would be

of interest to test whether all of these chemotherapeutic agents could equally affect the release and cytosolic activity of Smac/DIABLO. These results would provide an additional basis for the intrinsic and/or acquired resistance of cancer cells to chemotherapeutics and should help to direct future research for new therapeutic strategies.

In conclusion, in the present report we show that survivin is a key regulator of Smac/DIABLO differential release from mitochondria during apoptosis induced by DNA damage. This is accomplished by the upregulation of survivin and subsequent direct association of these two proteins in mitochondria of cells exposed to etoposide.

## Materials and methods

### Cell culture

HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 5% fetal bovine serum. Cells were cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell viability assays

To determine the LD<sub>50</sub> of staurosporine and etoposide, cells were seeded in 24-well plates and exposed to several concentrations of the relevant drug at the times indicated. After drug exposure, viability was determined using the crystal violet method (Ishiyama *et al.*, 1996). All experiments were performed in triplicate in three independent experiments.

### Induction and assessment of apoptosis

Apoptosis was induced by exposure to either staurosporine at the LD<sub>50</sub> (250 nM) for 24 h or etoposide at the LD<sub>50</sub> (100 μM) for 48 h. Vehicle used in all the experiments was 0.001% dimethyl sulfoxide in phosphate-buffered saline. Nuclear morphology was assessed with ethidium bromide staining (Martinez-Velazquez *et al.*, 2007).

## References

- Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* **20**: 6627–6636.
- Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N *et al.* (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem* **278**: 17593–17596.
- Deng Y, Lin Y, Wu X. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* **16**: 33–45.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33–42.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. (1996). A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* **19**: 1518–1520.
- Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL *et al.* (2003). Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced

### RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. RT-PCR were performed using the ThermoScript RT-PCR kit (Invitrogen) and Amplitaq Gold (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A curve was generated for each sample to verify that the amplification reactions proceeded logarithmically. The PCR products were normalized to those obtained from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA amplification. Gene expression measurements were repeated three times.

### Western blot analysis

A total of 40 μg of protein was separated by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted to polyvinylidene difluoride membranes. Blots were incubated in 0.1% (v/v) Tween-20 in TRIS-buffered saline (TBS-T) with 5% nonfat dry milk (blocking solution) for 1 h at room temperature. The blots were then incubated in fresh blocking solution with the specific primary antibody at the appropriate dilution overnight at 4°C. The blots were washed four times in TBS-T and then incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. The blots were again washed and the specific bound secondary antibody visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). All the experiments were performed at least three times.

Additional information for this section is presented in the 'Supplementary Information' archive available online.

## Acknowledgements

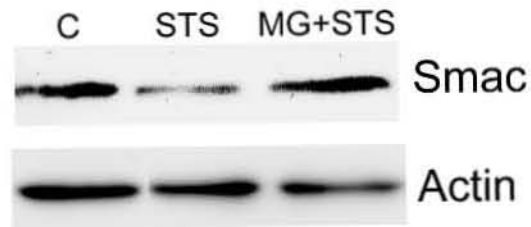
We thank Dr Stanley Korsmeyer for the kind gift of the BK-KS-Bcl-2 plasmid. This work was supported by grant C01-45728 from CONACyT to J Melendez-Zajgla. G Ceballos-Cancino was supported by a fellowship from CONACyT. The present work was part of G Ceballos-Cancino doctoral thesis from the UNAM (Biomedical Doctorate Program, Faculty of Medicine).

- mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome *c* and Smac/DIABLO release. *Cancer Res* **63**: 1712–1721.
- Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. (2002). The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome *c*. *J Biol Chem* **277**: 16547–16552.
- Lim ML, Chen B, Beart PM, Nagley P. (2006). Relative timing of redistribution of cytochrome *c* and Smac/DIABLO from mitochondria during apoptosis assessed by double immunocytochemistry on mammalian cells. *Exp Cell Res* **312**: 1174–1184.
- Ling X, Bernacki RJ, Brattain MG, Li F. (2004). Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *J Biol Chem* **279**: 15196–15203.
- MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination *in vitro*. *J Biol Chem* **277**: 36611–36616.
- Martinez-Velazquez M, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. (2007). Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cell Signal* **19**: 1212–1220.

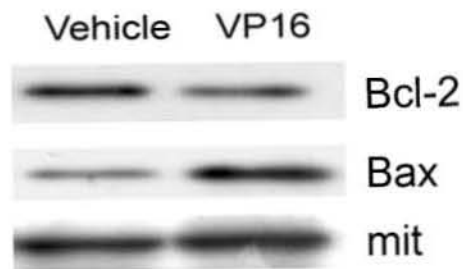
- McNeish IA, Lopes R, Bell SJ, McKay TR, Fernandez M, Lockley M *et al.* (2005). Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* **302**: 69–82.
- Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem (Tokyo)* **137**: 125–132.
- O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. (2002). A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**: 43–54.
- Song Z, Yao X, Wu M. (2003). Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 23130–23140.
- Tirro E, Consoli ML, Massimino M, Manzella L, Frasca F, Sciacca L *et al.* (2006). Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res* **66**: 4263–4272.
- Verhagen AM, Vaux DL. (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* **7**: 163–166.
- Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. (2003). Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* **63**: 230–235.
- Yamaguchi H, Bhalla K, Wang HG. (2003). Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res* **63**: 1483–1489.
- Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T, Hersey P. (2003). Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* **22**: 2869–2881.
- Zhou LL, Zhou LY, Luo KQ, Chang DC. (2005). Smac/DIABLO and cytochrome *c* are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis. *Apoptosis* **10**: 289–299.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).

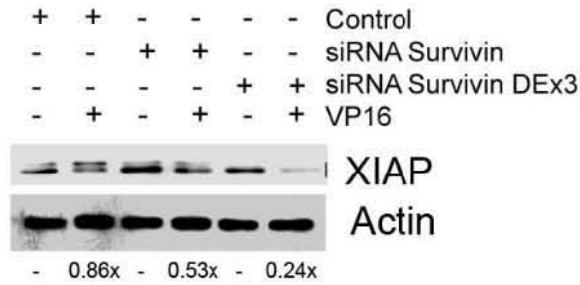




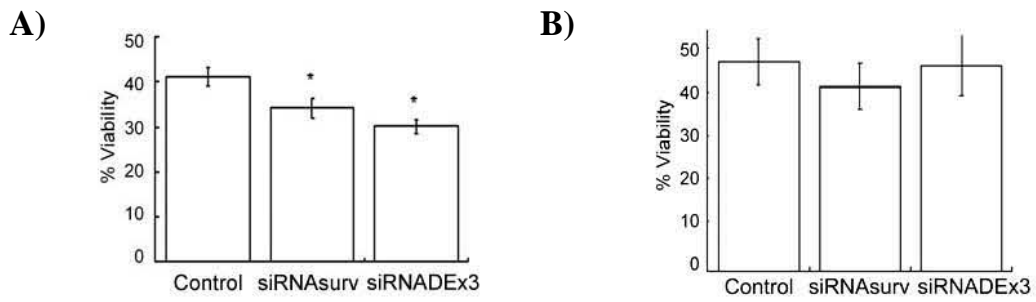
**Supplemental Figure 1.** HeLa cells were exposed for 8 hours to staurosporine (STS) or staurosporine plus proteasome inhibitor MG132 (MG+STS) and Smac protein levels analyzed by Western Blot assays. Exposure the proteasome inhibitor alone did not produce differences in Smac/DIABLO steady-state levels at this time point. Longer exposure to MG132 proved to be toxic. An antibody against Actin was used as a loading control.



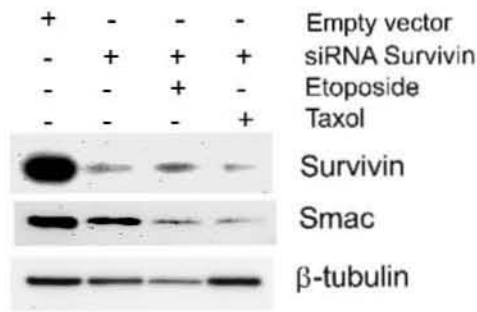
**Supplemental Figure 2.** HeLa cells were exposed to the LD<sub>50</sub> of etoposide (VP16) for 24 hours. Subcellular fractions were obtained and mitochondrial Bcl-2 and Bax levels analyzed by Western Blot assays. An antibody against mitochondria (mit) was used as a loading control.



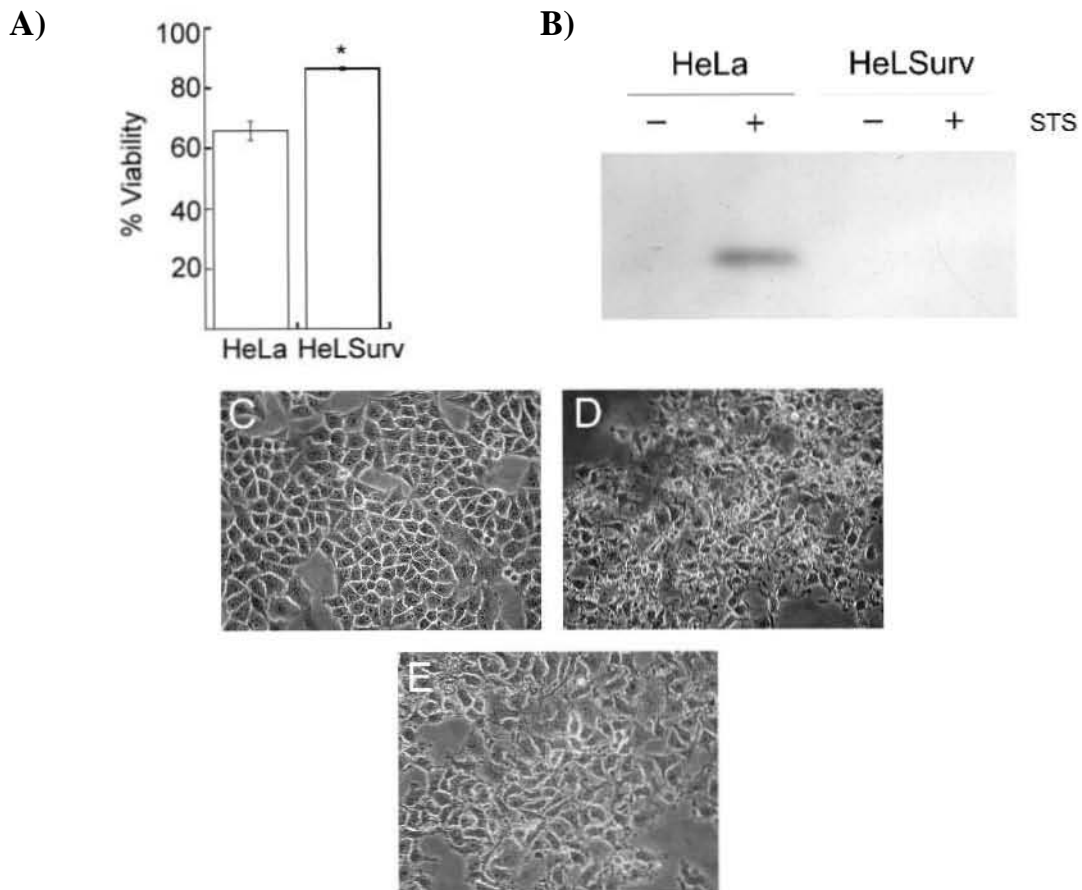
**Supplemental Figure 3.** HeLa cells were transfected with either an empty plasmid or a plasmid containing a survivin siRNA or survivin DeltaEx3 siRNA under the control of an U6 promoter. Cells were then exposed to the LD<sub>50</sub> of etoposide (VP16) and XIAP protein levels analyzed by Western Blot assays. Densitometric analysis of three independent experiments were performed and normalized results showed (x=times changed in cells exposed to etoposide versus vehicle for each transfected cell line).



**Supplemental Figure 4.** HeLa cells were transfected with either an empty plasmid, a plasmid containing a survivin siRNA or a plasmid with a survivin DeltaEx3 siRNA under the control of an U6 promoter. Cells were then exposed to the LD<sub>50</sub> of A) etoposide (VP16) or B) staurosporine. \* p<0.05



**Supplemental Figure 5.** HeLa cells were transfected with either an empty plasmid or a plasmid containing a survivin siRNA under the control of an U6 promoter. Cells were then exposed to paclitaxel or etoposide and total survivin or Smac protein levels analyzed by Western Blot assays.



**Supplemental Figure 6.** HeLa cells stably transfected with either an empty plasmid (HeLa) or a plasmid containing survivin open reading frame (HeLSurv) were exposed to the LD<sub>50</sub> of staurosporine and A) Viability or B) Cleaved caspase 3 protein levels assessed as described in Material and Methods. \* p<0.05. Phase contrast microscopy of C) HeLa cells exposed to vehicle, D) HeLa cells exposed to the LD<sub>50</sub> of staurosporine or E) HeLSurv exposed to the LD<sub>50</sub> of staurosporine..

Supplemental data

## **Materials and Methods**

### *Reagents*

DMEM was purchased from Invitrogen; fetal bovine serum from MP Biomedicals; puromycin, etoposide and staurosporine from Sigma (MO, USA); and olomoucine from Promega. The following antibodies were used: rabbit polyclonal antibodies against cleaved caspases 9, 3 and 7 from Cell Signaling; rabbit polyclonal antibody against Smac/DIABLO from Oncogene; mouse monoclonal antibodies against cytochrome *c*, c-IAP-1 and hILP/XIAP from BD Biosciences; rabbit polyclonal anti-mitochondria from Chemicon; rabbit polyclonal antibodies against Survivin, Caspase 8 and goat polyclonal anti-Smac/DIABLO (V17), from Santa Cruz Biotechnologies; mouse monoclonal antibody against cleaved PARP from Cell Signalling; mouse monoclonal antibody against nucleolin (C23) from Santa Cruz Biotechnology; rabbit polyclonal anti-Bax and mouse monoclonal anti-Bcl-2 from DAKO. Antibodies to survivin isoforms were: Survivin DEx3 polyclonal antibody (Abcam ab3731) and Survivin 2B polyclonal antibody (Abcam ab3729). Secondary antibodies used were purchase from Promega. Mouse monoclonal anti-actin was a kind gift from Dr. Herrera (Instituto Politecnico Nacional). Chemiluminescent detection reagents ECL Plus Western Blotting were purchased from Amersham Biosciences. A commercial protease inhibitor cocktail was included in all the buffers used for cellular lysis, as recommended by the manufacturer.

### *Subcellular fractionation*

Cells were collected, washed once with PBS and resuspended in RIPA buffer (1% (v/v) NP-40, 5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, in PBS), passed through a 30-gauge

syringe 10 times and incubated in ice for 10 minutes to generate a whole cell lysate. Lysates were then centrifuged at 10,000 g for 30 minutes and the supernatant was collected as total protein. Fractionation to separate mitochondrial and cytosolic proteins was carried out according to Adrain *et al.* with minor modifications (Adrain *et al.*, 2001). Briefly, cells were collected, washed with PBS and resuspended in cytosolic lysis buffer (250 mM sucrose, 70 mM KCl, 137 mM NaCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2, 200 µg/ml digitonin, 100 mM PMSF, protease inhibitor cocktail) for 5 minutes on ice. Cells were centrifuged at 1,000 g for 5 minutes; the supernatant was kept as the cytosolic fraction and the pellet was resuspended in two volumes of mitochondrial lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% (v/v) Triton X-100, 0.3% NP-40, PMSF, protease inhibitor cocktail) for 5 minutes on ice. The resulting suspension was centrifuged at 10,000 g for 10 minutes and the supernatant was collected as the mitochondrial fraction. To obtain nuclear and cytosolic proteins, cells were harvested by centrifugation and the pellet was washed with PBS. Approximately 6 x 10<sup>6</sup> cells were resuspended in 1 ml A buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, PMSF, protease inhibitors cocktail) for 15 minutes on ice. 50 µl 10% (w/v) NP-40 were added, the suspension was immediately centrifuged at 5,000 g for 5 minutes and the supernatant was saved as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in 330 µl of C buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 400 mM NaCl, 1mM EDTA, PMSF, protease inhibitors cocktail) and incubated for 30 minutes on ice with occasional mixing and centrifuged at 5,000 g for 5 minutes; the supernatant was collected as the nuclear fraction.

*RNA interference vector and antisense construction*

To construct a vector for RNA interference expression, a 600-bp fragment of the U6 promoter, amplified by PCR, was cloned into the pGEM-T Easy (Promega) plasmid. Survivin and survivin DeltaEx3 siRNAs were generated by cloning 21 bp specific sequences under the U6 promoter control (Espinosa *et al.*, in preparation). The antisense Bcl-2 vector was constructed by subcloning a Bcl-2 sequence from BK-KS-Bcl2, kindly donated by Dr. Stanley Korsmeyer, in the antisense orientation in the pcDNA 3.1 vector. HeLa cells were transfected with 1 µg of the respective siRNA constructs or empty vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The specificity of the siRNAs was verified by RT-PCR and western blot assays.

#### *Survivin overexpression*

The survivin open reading frame was amplified by RT-PCR and cloned in vector pTZ57R/T (Fermentas, ON, Canada) following the manufacturer's protocol. The survivin ORF was subcloned in pQCXIP (Clontech). pQCXIP-survivin and an empty vector were transfected in HeLa cells and stably transfected cells were selected with puromycin for three weeks. A pool of clones was used for subsequent experiments. Survivin overexpression was verified by western blot.

#### *Immunoprecipitation*

Cells seeded on 100-mm dishes were rinsed two times in PBS and harvested. The cellular pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) NP-40, protease inhibitor cocktail) at a density of  $10^7$  cells/ml and incubated for 30 minutes on ice with occasional mixing and centrifuged at maximal speed in a 4°C microcentrifuge. The supernatant was transferred to a fresh tube for immunoprecipitation. The lysate was precleared with Protein G PLUS-Agarose

(Santa Cruz Biotechnology) for 60 minutes at 4°C with gentle agitation, centrifuged at 5,000 *g* in a 4°C microcentrifuge for 15 seconds and the supernatant was transferred to a fresh tube. This lysate was immunoprecipitated overnight at 4°C using Protein G PLUS-Agarose and anti-Smac/DIABLO or anti-survivin antibodies. The beads were washed three times with lysis buffer, resuspended in 2X Laemli sample buffer and boiled for 10 minutes to release bound proteins. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes for immunoblotting.

#### *p34(cdc2) inhibition*

HeLa cells were pretreated with 100  $\mu$ M olomoucine for 1 hour. After this time, the cells were co-treated with the LD<sub>50</sub> of etoposide (100  $\mu$ M) for 14 hours more. Controls with agents alone and DMSO, were cultured for the same period. Total proteins were obtained and subjected to immunoblot.