



**Doktorego Tesia**

# **Membrane activities of Dynamin- Related Protein 1 (DRP1) and BCL2- Related Ovarian Killer (BOK)**

Itsasne Bustillo Zabalbeitia

2015

Zuzendariak: Gorka Basañez Asua eta Oihana Terrones Urio

Biofisika Unitatea (CSIC-UPV/EHU)

Biokimika eta Biologia Molekularra Saila



**Doctorego Tesia**

**Membrane activities of Dynamin-  
Related Protein 1 (DRP1) and BCL2-  
Related Ovarian Killer (BOK)**

Itsasne Bustillo Zabalbeitia

2015

Zuzendariak: Gorka Basañez Asua eta Oihana Terrones Urio



## **Aitorpena**

Doktoregaiak Eusko Jaurlaritzatik Doktoretza-aurreko beka bat (2010-2014) lortu zuen. Ikerketa hau hurrengo proiektuekin finantzatua izan da: Eusko Jaurlaritza, IT838-13; Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), EHU-1374 eta Espainiao Gobernuko Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren BFU 2011-28566.



***Ama, aita eta Iboneri***





# AURKIBIDEA

Laburduren eta sinboloen zerrenda.....	i
1. SARRERA ETA HELBURUAK.....	1
1.1 MITOKONDRIOA.....	1
1.1.1 SARRERA.....	1
1.1.2 MITOKONDRIOAREN FUNTZIOA ZELULA OSASUNTSUETAN.....	7
1.1.3 MITOKONDRIOAREN FUNTZIOA HERIOTZ ZELULARREAN.....	10
1.1.3.1 Apoptosiarekin erlazionatutako lipidoen eginkizuna heriotz zelularrean.....	14
1.1.4 KARDIOLIPINA.....	17
1.1.4.1 Egitura.....	18
1.1.4.2 Biosintesia eta degradazioa.....	19
1.1.4.3 Erlazionatutako gaixotasunak.....	22
1.1.4.4 CLrekin interakzionatzen duten proteinak.....	24
1.1.5 FUSIO/FISIO MITOKONDRIALAREN MAKINARIA.....	30
1.1.5.1 Fusio makinaria.....	30
1.1.5.2 Fisio makinaria.....	37
1.1.6 BCL2 FAMILIAKO PROTEINAK.....	43
1.1.6.1 BCL2 familiako proteinen egitura soluzioan.....	46
1.1.6.2 BCL2 familiako proteinek bideratutako MOMParen erregulazioaren ikuspuntu orokorra.....	48
1.1.6.3 BCL2 familiako kideen funtzio ez apoptotikoak.....	62
1.1.6.4 BOK.....	66
1.2 HELBURUAK.....	68
2. TEKNIKA ESPERIMENTALAK.....	71
2.1 BERRERAIKITAKO EREDU SISTEMAK.....	71
2.1.1 Osagai lipidikoa.....	71
2.1.1.1 Lipidoak: sailkapena eta ezaugarriak.....	71
2.1.1.2 Mintz-ereduen sistemak.....	74

2.1.1.3	Mintz-eredu sistemen karakterizazioa.....	80
2.1.2	Osagai proteikoa.....	82
2.1.2.1	Biologia molekularrean metodoak.....	82
2.1.2.2	Proteinen arazketa.....	87
2.1.2.3	Proteinen karakterizazioa.....	96
2.2	BERRERAIKITAKO EREDU SISTEMEKIN ERLAZIONATUTAKO METODOAK.....	99
2.2.1	Egitura azterketak.....	99
2.2.1.1	Proteinen kristalizazioa.....	99
2.2.1.2	Dikroismo zirkularra.....	102
2.2.2	Proteina-lipido elkarrekintzak.....	107
2.2.2.1	Dot plapaketa.....	109
2.2.2.2	Gainazaleko plasmioen erresonantzia.....	111
2.2.2.3	Sakarosa gradiente bidezko flotazio zentrifugazioa.....	113
2.2.2.4	Lipido monogeruzak.....	114
2.2.3	Mintz iragazkortze eta lipido nahasketa saioak.....	116
2.2.3.1	GUV iragazkortze saioa.....	116
2.2.3.2	Lipido-nahasketa esperimentuak.....	119
2.2.3.3	Argi dinamikoaren dispertsio esperimentuak.....	120
2.2.3.4	Krio-finkapenean oinarritutako mikroskopia elektronikoa.....	120
2.2.3.5	Transmisio elektroik mikroskopia (TEM).....	121
2.2.4	Soluzioan edota mintzean gertatzen diren proteina:proteina elkarrekintzak aztertzeko metodoak.....	122
2.2.4.1	<i>In vitro</i> pull-down esperimentuak.....	122
2.2.4.2	Gel natiboak.....	123
2.2.4.3	Oligomerizazio saioak.....	125
2.2.5	Aktibitatea neurtzeko saioak.....	126
2.2.5.1	GTPasa aktibitate saioa.....	126
2.3	<i>ex vivo</i> saioak.....	126
2.3.1	Mitokondrio saioak.....	126
2.3.1.1	Sagu fibroblasto kultiboetatik mitokondrioen isolaketa.....	126

2.3.1.2	c zitokromo askapen saioak .....	128
2.3.2	zelula eukariotiko prozedurak .....	128
2.3.2.1	kultibo zelularra.....	128
2.3.2.2	Transfekzio iragankorrerako plasmidoak .....	128
2.3.2.3	Transfekzio iragankorra.....	129
2.3.2.4	Zelula eukariotoen lerro zelular egonkorretantransfekzio induzigarrirako plasmidoak .....	129
2.3.2.5	Lerro zelular egonkor induzigarren ekoizpena.....	130
2.3.2.6	Transfekzio induzigarria .....	131
2.3.2.7	Zelulen fixaketa eta iragazkortzea.....	131
2.3.2.8	Immunofluoreszentzia tindaketa .....	132
2.3.2.9	Fluxu zitometria saioak .....	133
2.3.2.10	Frakzionamendu azpizelular saioak.....	134
2.3.2.11	Sodio karbonato tratamendua .....	135
2.3.2.12	GFP-Trap immunoprezipitazioa.....	135
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	139
3.1	KARDIOLIPINAREKIKO INTERAKZIO ESPEZIFIKOAK DRP1 PROTEINAREN AKTIBAZIO FUNTZIONALA ERAGITEN DU .....	139
3.1.1	SARRERA .....	139
3.1.2	MATERIALAK ETA METODOAK .....	141
3.1.3	EMAITZAK .....	145
3.1.3.1	DRP1ek CLrekin espezifikoki interakzionatzen du.....	145
3.1.3.2	DRP1en B intsertoaren bidez ematen da CLrekiko interakzioa.....	149
3.1.3.3	DRP1ek CLrekin duen elkarrekintzak proteinaren GTPasa aktibitatea areagotzen du .....	151
3.1.3.4	DRP1 CL-dun liposometan oligomerizatzen da .....	155
3.1.4	EZTABAIDA.....	157
3.2	RECOMBINANT BOK EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION.....	160
3.2.1	INTRODUCTION .....	160
3.2.2	MATERIALS AND METHODS.....	161

3.2.3	RESULTS .....	163
3.2.3.1	Expression of BOK FL.....	163
3.2.3.2	Expression of BOK $\Delta$ C.....	166
3.2.3.3	BOK $\Delta$ C purification.....	168
3.2.3.4	BOK $\Delta$ C characterization .....	172
3.2.4	DISCUSSION .....	177
3.3	EVALUATING THE INTERACTION OF BOK WITH MITOCHONDRIAL LIPIDS AND WITH BH3-ONLY PROTEINS.....	179
3.3.1	INTRODUCTION .....	179
3.3.2	MATERIALS AND METHODS.....	181
3.3.3	RESULTS.....	186
3.3.3.1	BOK $\Delta$ C6His interacts with CL-rich model membranes.....	186
3.3.3.2	CL interaction produces localized structural changes in BOK $\Delta$ C6His.....	192
3.3.3.3	BH3-only proteins do not interact physically or functionally with BOK $\Delta$ C6His..	194
3.3.4	DISCUSSION .....	198
3.4	STUDYING BOK LOCALIZATION FUNCTION AND INTERACTING PARTNERS IN THE CELLULAR ENVIRONMENT.....	201
3.4.1	INTRODUCTION .....	201
3.4.2	MATERIALS AND METHODS.....	204
3.4.3	RESULTS.....	210
3.4.3.1	BOK co-localizes partially with mitochondria.....	210
3.4.3.2	BOK induces apoptotic cell death in presence and absence of BAX /BAK ....	214
3.4.3.3	BOK induces changes in mitochondrial morphology .....	220
3.4.3.4	BOK can induce remodelling of CL containing membranes <i>in vitro</i> .....	223
3.4.3.5	Searching for BOK-interacting partners .....	226
3.4.4	DISCUSSION .....	240
ANNEX	.....	247
4.	OVERVIEW AND CONCLUSIONS.....	257
5.	REFERENCES.....	267

PUBLICATIONS.....	311
-------------------	-----

## Laburduren eta sinboloen zerrenda

$\lambda$	Wavelength/Uhin luzera
$\pi$	Surface pressure /Gainazal presioa
$\pi_0$	Initial surface pressure/Hasierako gainazal presioa
$\pi_c$	Critical pressure/presio kritikoa
$\Delta\pi$	Increase in the surface pressure/Gainazal presioaren handipena
AAC	ADP/ATP carrier
ADOA	Autosomal dominant optic atrophy/Atrofia optiko autosomiko dominantea
ALCAT1	Acyl-CoA lysocardiolipin acyltransferase 1
ANT	Adenine nucleotide translocator
ANTS	8-aminonaphthalene-1,3,6 trisulfonate (ANTS)
APAF-1	Apoptosis protease activator factor
APC	Allophycocyanin/Alofikoziarina
BAK	BCL-2 Associated Killer protein
BAX	BCL-2 Associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	BCL2 homology domain/BCL2 homologia domeinua
BID	BH3 interacting domain death agonist (full-length protein)
BIM	BCL2-interacting mediator of cell death
BOK	BCL2-related ovarian killer
BSA	Bovine Serum Albumin/Behi serumaren albumina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cBID	Caspase-8-cleaved BID/8-kaspasak moztutako BID
CD	Circular dichroism/Dikroismo zirkularra
Cdko	Cyclin dependent kinase/Ziklina menpeko kina
CER	Ceramide/Zeramida
CHOL	Cholesterol/Kolesterola
CJ	Cristae junctions/Gangar loturak
CL	Cardiolipin/Kardiolipina
CM	Cristae membrane/Gangar mintza
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CS	Contact sites/Elkargune mitokondrialak
Cyt c	Cytochrome c/c-zitokromoa
DAG	Diacylglycerol/Diazilglicerola

DLS	Dynamic Light Scattering/Argi dinamikoaren dispertsioa
DRP1	Dynamin-related protein 1
ER	Endoplasmic reticulum/Erretikulu endoplasmatikoa
ERMES	ER-mitochondria encounter structure
FADD	Fas-associated death domain
GED	GTPase effector domain/GTPasa domeinu efektorea
Fzo	Fuzzy onion gene
GFP	Green fluorescent protein/Proteina fluoreszente berdea
GST	Glutathione S-transferase
GUV	Giant unilamellar vesicle/Besikula unilamelar erraldoiak
HCT 116	Human colorectal carcinoma cells/Giza kolon-ondesteko kartzinoma zelulak
HEK 293T	Human embryonic kidney 293 cells/Giza giltzurrun enbrioniko 293 zelulak
HeLa	Cervical cancer cells/Minbizi zerbikal zelulak
HEX	Hexadecenal/Hexadezenala
HR	Heptad-repeat domain/Heptada errepikapen domeinua
HRP	Horseradish peroxidase/Errefau peroxidasa
IAPs	Inhibitors of caspases/Kaspasen inhibitzaileak
IBM	Inner boundary membrane/Barneko muga mintza
ICS	Inter cristae space/Gangar arteko gunea
IFN2	Inverted formin 2
IMS	Inter membrane space/Mintz arteko gunea
IP <sub>3</sub> Rs	Inositol (1,4,5)-triphosphate receptor/Inositol(1,4,5)-trifosfato hartzailea
KHE	100mM KCl, 10mM Hepes, 1mM EDTA, pH 7.4
LPC	Lysophosphatidylcholine/Lisofosfatidilkolina
LUV	Large unilamellar vesicle/Besikula unilamelar handiak
MAM	Mitochondria-associated ER membrane/Mitokondriara asoziatutako ER-mintza
MARCH-V	Membrane associated RING-CH-V
MCL	Monolysocardiolipin/Monolisokardiolipina
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia-1
MCU	Mitochondrial calcium uniporter/Mitokondriako kaltzio uniporterra
MEF	Mouse embryonic fibroblast/Sagu enbrioi fibroblastoak
MFF	Mitochondrial fission factor
MFN1	Mitofusin1
MFN2	Mitofusin2

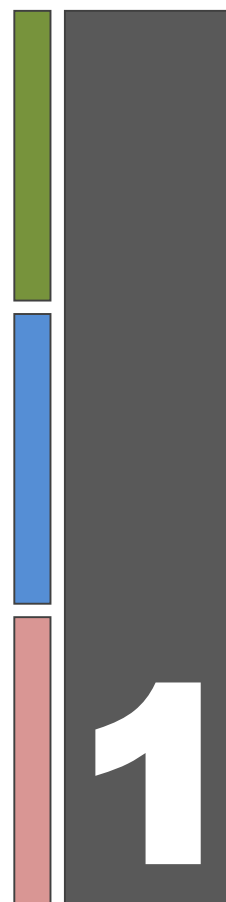
MIB	Mitofusin binding protein
MiD49	Mitochondrial dynamics protein of 49 KDa
MiD51	Mitochondrial dynamics protein of 51 KDa
MIM	Mitochondrial inner membrane/Mitokondriako barne mintza
MLCLAT1	Monolysocardiolipin acyltransferase
MLV	Multilamellar large vesicle/Besikula multilamelar handiak
MOM	Mitochondrial outer membrane/Mitokondriako kanpo mintza
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization/Mitokondriako kanpo mintzaren iragazkortzea
MPP	Mitochondrial processing peptidase
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore/Mitokondriako behin-behineko iragazkortze poroa
mtDNA	Mitochondrial DNA/DNA mitokondriala
MTS	Mitochondrial targeting sequence/Mitokondriora bideratzeko sekuentzia
NMR	Nuclear Magnetic Resonance/Erresonantzia magnetiko nuklearra
NO	Nitric oxide/Oxido nitrikoa
OG	octyl $\beta$ -D-glucopyranoside
OPA1	Optoc atrophy 1
PA	Phosphatidic acid/Azido fosfatidikoa
PBS	Phosphate Buffered Saline/Fosfato gatz indargetzailea
PBT	Phosphate-buffered saline with Tween 20/Tween 20 duen fosfato gatz indargetzailea
PC	Phosphatidylcholine/Fosfatidilkolina
PE	Phosphatidylethanolamine/Fosfatidiletanolamina
PG	Phosphatidylglycerol/Fosfatidilglicerola
PGP	Phosphatidylglycerolphosphate /Fosfatidilglicerolfosfatoa
Pgs1	Phosphatidylglycerolphosphate synthase/Fosfatidilglicerolfosfato sintasa
PI	Phosphatidylinositol/Fosfatidilinositol
PKA	cAMP-dependent protein kinase/cAMP-menpeko protein kinasa
PS	Phosphatidylserine/Fosfatidilserina
PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis
Rh	Rhodamine/Rodamina
RNAi	RNA interference/RNA interferentzia
ROS	Reactive oxygen species/Oxigeno espezie erreaktiboak
S1P	Sphingosine-1-phosphate/Esfingosina-1-fosfatoa
SD	Standard Deviation/Desbiderapen tipikoa
SE	Standard Error/Errore tipikoa



SEC	Size exclusion chromatography/Tamainaren arabera bereizteko kromatografia
Sumo	Small ubiquitin-like modifier
SUV	Small Unilamella Vesicle/Lamela bakarreko besikula txikiak
tBID	Truncated-BH3 interacting domain death agonist (p15 active fragment, also known as t <sup>c</sup> BID)
Taz1	Tafazzin
TCA	Tricarboxylic acid/Azido trikarboxilikoa
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine
TEM	Transmission electron microscopy/Trasmiziozko mikroskopia elektronikoa
TIM	Translocase of the inner membrane/Barne mintzeko translokasa
TNF	Tumor necrosis factor
TOM	Translocase of the outer membrane/Kanpo mintzeko translokasa
TX100	Triton-X 100
VDAC	Voltage anion conductance



# 1 KAPITULUA: SARRERA ETA HELBURUAK





# 1. SARRERA ETA HELBURUAK

## 1.1 MITOKONDRIOA

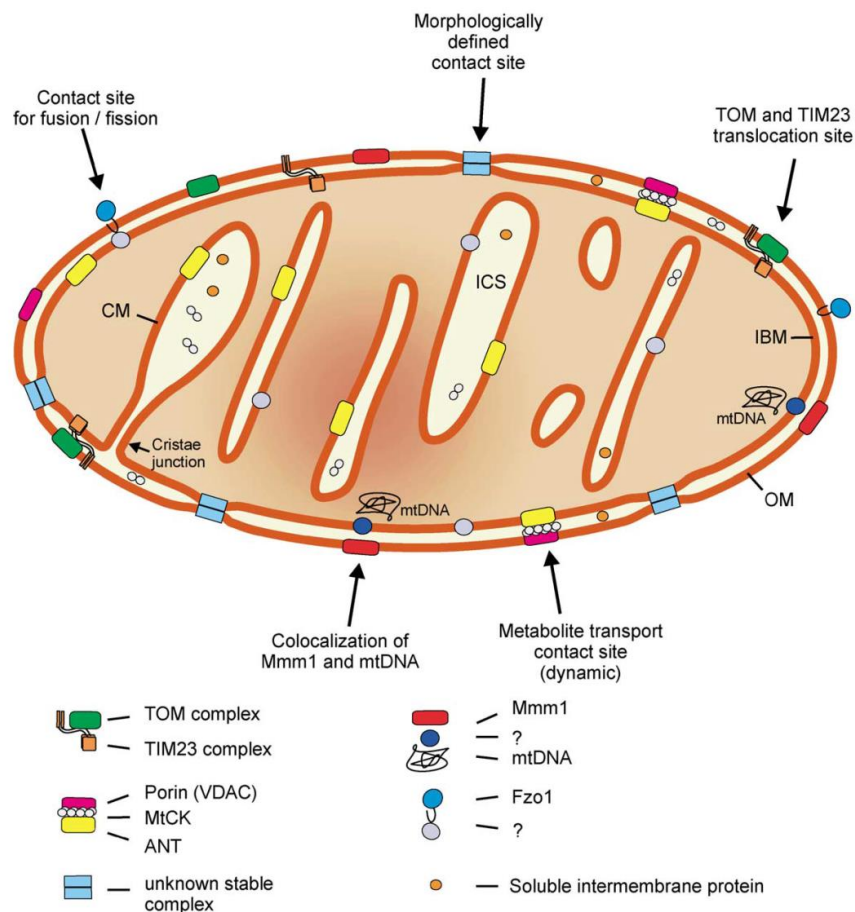
### 1.1.1 SARRERA

Mitokondrioak zelula eukariotikoen ezinbesteko organuluak dira. Partzialki autonomoak dira, euren DNA, RNA eta proteinen sintesirako makinaria propioak dituztelako. Gainera, mitokondrioak zenbait lipido beraien kabuz sintetizatzeke gai ere badira (Horvath & Daum, 2013). Mitokondrioak jatorri bakterianoa duela uste da eta agian azken sinbionte bilakatu da. Hipotesi hau ebidentzia esperimental askok sustengatzen dute, bakterioen eta mitokondriaren DNA eta itzulpen aparatuen antzekotasunek besteak beste (Kutik *et al.*, 2009) .

Mitokondrioa parekorik ez duen organulu egiten duen ezaugarrietako bat, bere genoma propioaren presentzia da. DNA mitokondrial (mtDNA) genoma zirkular sinplea da, bakterio primitiboaren DNA zirkularrekin alderatuz oso ezaugarri egiturak antzekoak dituena (Diaz & Moraes, 2008; Duchon, 2004; Margulis & Bermudes, 1985; Margulis, 1975; Shutt & Gray, 2006). mtDNA 16.6kb eta 37 gen dituen harizpi bikoitzeko DNA zirkularra da. Gen horietako hamahiruk proteinak kodetzen dituzte, proteina guzti hauek arnasketa katearen osagaiak direlarik. Mitokondrioa eratzeke beharrezkoak diren beste proteina guztiak nukleoan kodetu eta mitokondriora garraituak izaten dira. mtDNA genomak 22 tRNA mitokondrial eta mtDNA transkriptoaren itzulpenarako ezinbestekoak diren 2 rRNA mitokondrial ere kodetzen ditu (Chan, 2006a; Diaz & Moraes, 2008; Duchon, 2004). Mitokondrioko kode genetikoak kode nuklear unibertsalek bereizten da. TGA kodoiak triptofanoa kodetzen du stop kodetu beharrean, AGA eta AGG stop kodoiak dira arginina kodetu beharrean eta ATA-k metionina kodetzen du isoleuzina beharrean. mtDNA zenbait proteinek elkartzen da nukleoide izeneko egituretan enpakaturik, egitura hauek mitokondrioko barne mintzarekin ere elkartzen direlarik (Anderson *et al.*, 1981; Diaz & Moraes, 2008). Nahiz eta zenbait DNA konponketa mekanismo daude mitokondriotan, nukleotido erauzien konponketarik ez da gertatzen eta mtDNA zenbait lesio jasateko oso sentikorra da (Chan, 2006a; Larsen *et al.* 2005). mtDNAn ematen diren kalte hauek zahartzearekin erlazionatuta daude eta gaixotasun desberdinak eragin ditzakete.

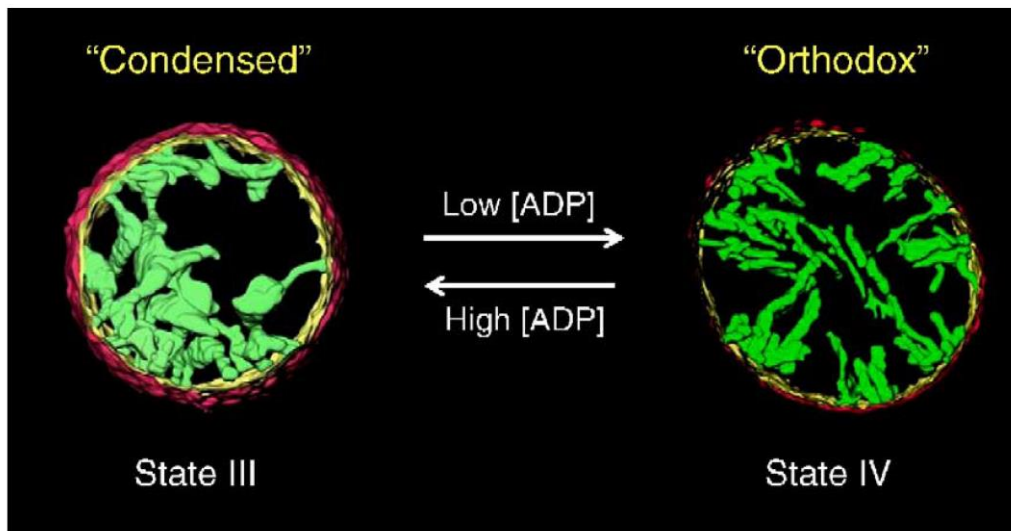
Bereizgarria den DNA propioaren presentziaz gain, mitokondrioak beraien funtzio ugari eta korapilatsuen oinarri den mintz sistema bakar eta konplexua ere badu (Harner *et al.*, 2011). Organulu hauek kanpo (MOM, ingelesezik *Mitochondrial Outer Membrane*) eta barne mintzaz (MIM, ingelesezik *Mitochondrial Inner Membrane*) osatutako bilkin batez inguratuta daude. MOM partzialki iragazkorra da molekula txiki eta espezie ionikoentzat. MIM ordea, funtsean

iragazkoitza da eta zitosola eta matrize mitokondrialaren arteko hesi nagusia eratzen du. MIM proteinetan aberatsena den mintz zelularra da, mitokondrioaren funtzio normalarentzat beharrezkoak diren proteinak eta proteina konplexuak dituelarik. MIM zenbait azpiataletan bana daiteke: barneko muga mintza (IBM, ingelesetik *Inner Boundary Membrane*), mintz jarraia da, hutsunerik ez duena eta MOMarekin aposizio estuan dago; eta gangarren mintza (CM, ingelesetik *Cristae Membrane*). Gangarrak IBMen inbaginazioak dira matrizerantza irtetzen direnak. Gangarrak eta IBMa tutu-formako egitura estuen bidez lotuta daude, egitura tubular hauek gangar loturak dira (CJ, ingelesetik *Cristae Junction*) (Reichert & Neupert, 2002). MOM eta MIM arteko gunea mintz arteko espazioa da (IMS, ingelesetik *Intermembrane Space*) oso gune estua da gangar arteko gunearekin konparatuz gero, gangar arteko gune hau gangar barneko gunea da (ICS, ingelesetik *Intracristae Space*). Bestalde, MOM eta IBMaren arteko elkarrekintza gune irmoak ere badaude, mitokondrioko mintzen antolakuntza egituralarentzat beharrezkoak direnak. Lotura hauek elkargune mitokondriak dira (CS, ingelesetik *Contact sites*) (1.1 Irudia).



**1.1 Irudia. Mitokondrioko osagai desberdinak.** Zeharkako mozketaren baten adierazpena da irudia. Gangarrak IBMari lotuta agertzen dira CJen bidez. OM, kanpo mintza; IBM, Barneko muga mintza; CM, gangar mintza; ICS, gangar arteko gunea. (Reichert & Neupert, 2002)-etik hartutako irudia.

Orain dela 60 urte inguru, transmisiozko mikroskopia elektroniko (TEM) egindako mitokondrioen lehen irudien agerpenarekin batera, mitokondrioek itxura desberdin asko izan ditzaketela ikusi izan zen. Zenbait ikerketa estentsibo egin ostean, mitokondrioan ematen ziren forma aldaketa horiek ausazkoak ez zirela eta organuluaren erregulazio mekanismo berria islatu lezaketela iradokitu zen. Izan ere, mitokondrioko mintzaren topologian emandako aldaketek funtzio mitokondrialean eragina izan dezaketela onartuta dago gaur egun (Mannella 2006).



**1.2 Irudia. MIM topologiaren aldaketa, egoera ortodoxotik kondentsaturako trantsizioa.** (Mannella, 2006)-tik hartutako irudia.

Hackenbrock-ek (Hackenbrock, 1966) mitokondrioan egon daitezkeen bi egoera morfologiko definitu zituen: kondentsatua eta ortodoxoa. Egoera kondentsatuan, mitokondrioak barne konpartimentu handiak ditu periferiako eskualdearekin tutu-itxurako lotura askorekin. Egoera honetan matrizea trinkoa da. Aitzitik, egoera ortodoxoan, matrizea zabaldua dago eta gangarrak tutu edo lamela laburrak dira IBMarekin lotura bakarra edo bi lotura dituztelarik (1.2 Irudia). Egoera hauen arteko interkonbertsioa mitokondriaren egoera energetikoaren araberkoa da eta bakarrik MIMaren fusio edo fisio prozesuen bidez eman daiteke (Mannella 2006). Prozesu hau itzulgarria dela ematen du, hori dela eta CJen eraketa dinamikoa proposatu izan da. Nahiz eta gero eta detaile egiturak gehiago dauden, oraindik ez dago argi CJ hauen garrantzi funtzionala zein den. Hipotesi batek esaten du CJek MIM azpiatalak eratzen paper erabakigarria izan lezaketela, IMS eta ICS arteko difusio hesi izanik. Ondorioz, MIM topologiak ATParen ekoizpenaren erregulazioan eragina izango luke ADParen fluxua mugatuz (Mannella, 2006; Zick *et al.*, 2009). Bestalde, Scorrano *eta* *lank.* proposatu zuten MIMaren topologiak prozesu apoptotikoan ere parte hartu lezakeela. Espezifikoki, talde honek erakutsi zuen BCL2 familiako kide den tBID proteinak, MIMaren eraldaketa azkarra eragiten duela CJen kopurua handituz eta MIMaren kurbatura alderantzizkatuz. MIM topologian ematen den aldaketa dramatiko hau

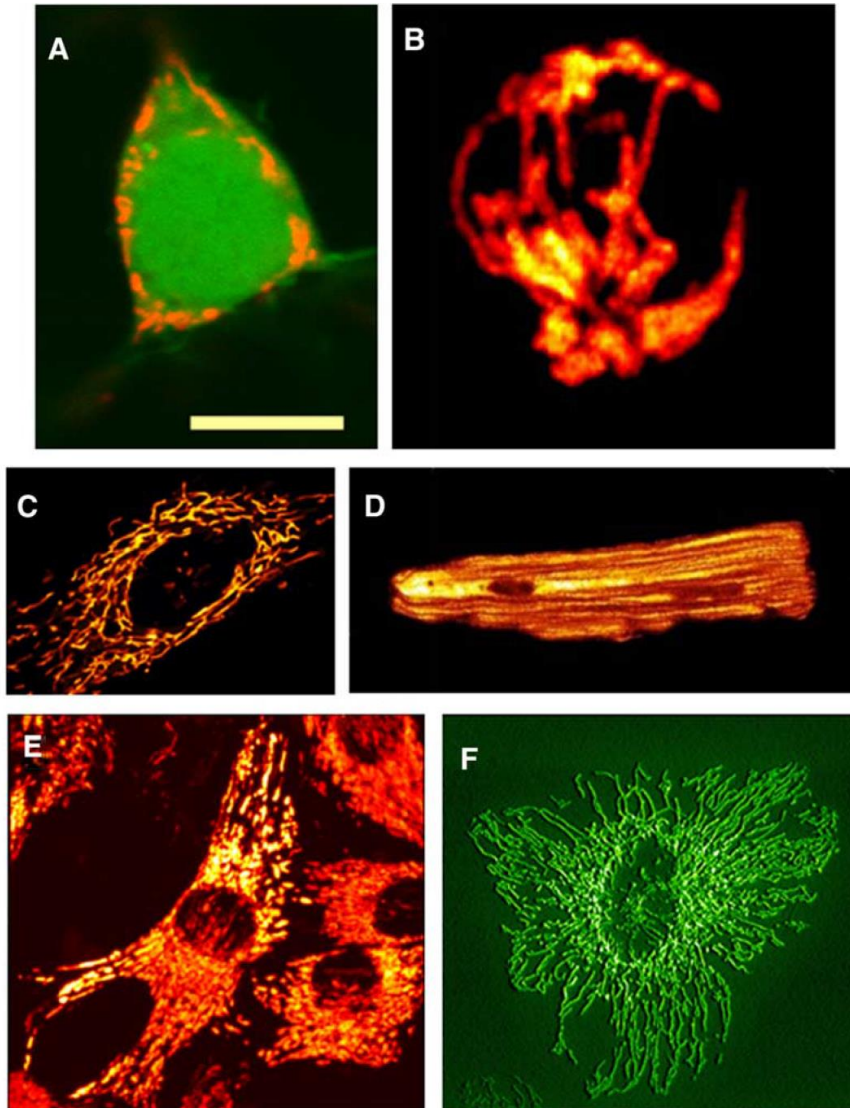
barneko c-zitokromoaren (cyt c) mugimenduaren handipenarekin bat dator. Gainera, cyt c gehiena gangarren barruan OPA1z osatutako konplexuez bahituta dagoela proposatu da eta ondorioz, OPA1 konplexuen desagitea kritikoa izango da cyt c gehiena IBMra askatu ahal izateko (Frezza *et al.*, 2006). Zentzu honetan, berriki proposatu da BCL2 familiako kide diren BAX eta BAK proteinek mitokondriako CSekin interakzionatzen dutela MOMaren iragazkortasunean eragina izanez eta OMA1en, MIMean kokatzen den proteasa baten, aktibazioan eraginez. BAX/BAK eta CSen arteko interakzioak OMA1en aktibitate proteolitikoaren handipena dakar, OPA1en autodegradazioaren bizkortzailea izanik eta ondorioz cyt c-aren askapena erraztuz (Jiang *et al.*, 2014).

Mitokondrioen egituraren ezaugarri makroskopikoak ehunaren, egoera fisiologikoaren eta garapen mailaren arabera aldatzen dira. Adibidez, ehun batzuetan mitokondrioek oso mugikorra den sare mitokondriala eratzen dute beste ehun batzuetan egitura independente eta diskretoak eratzen dituzten bitartean (1.3 Irudia).

Arestian aipatutako aldaketa morfologikoak fusio eta fisio mitokondrial prozesuen arteko orekak, hau da, dinamika mitokondrialak zehazten ditu. Dinamika mitokondrialean ematen diren asaldurek ondorio larriak izan ditzakete metabolismo zelularrean eta ondorioz zelulen bizian. Fisio eta fusioaren arteko desorekarekin lotuta dauden zenbait gaixotasunek bi prozesu hauen homeostiaren garrantzia nabarmendu dute. Fusio mitokondrialak mitokondrioen arteko edukien, mtDNA eta proteinak, trukea baimentzen du. Fisio mitokondrialak aldiz, mitokondrioen biogenesisia eta kaltetutako edo inaktibo dauden mitokondrioen autofagia bidezko deuseztapena baimentzen du (Diaz & Moraes, 2008).

Fisio eta fusio mitokondrialaren partaide nagusiak Dinaminen superfamiliako kideak dira. Dinaminek eta bere hurbileko ahaideek mintza berregituratzeko gaitasun intrintsekoa duten proteina taldea osatzen dute, berregituraketa hori oligomerizazio eta GTP hidrolisiarekiko menpekota delarik. Legamietan fusio mitokondrialean parte hartzen duten proteinak MOMera ainguratutako bi proteina, Fzo1 eta Ugo1 GTPasa eta MIMera ainguratutako Mgm1 GTPasa dira. Ugaztunetan, kanpo mintzeko fusioa Mitofusina 1 (MFN1) eta Mitofusina 2 (MFN2) proteinek burutzen dute, barne mintzeko fusioaz aldiz OPA1 proteina arduratzen delarik. Bestetik, organuluaren banaketa DNM1 GTPasak burutzen du legamietan eta DRP1ek ugaztunetan (1.4 Irudia).

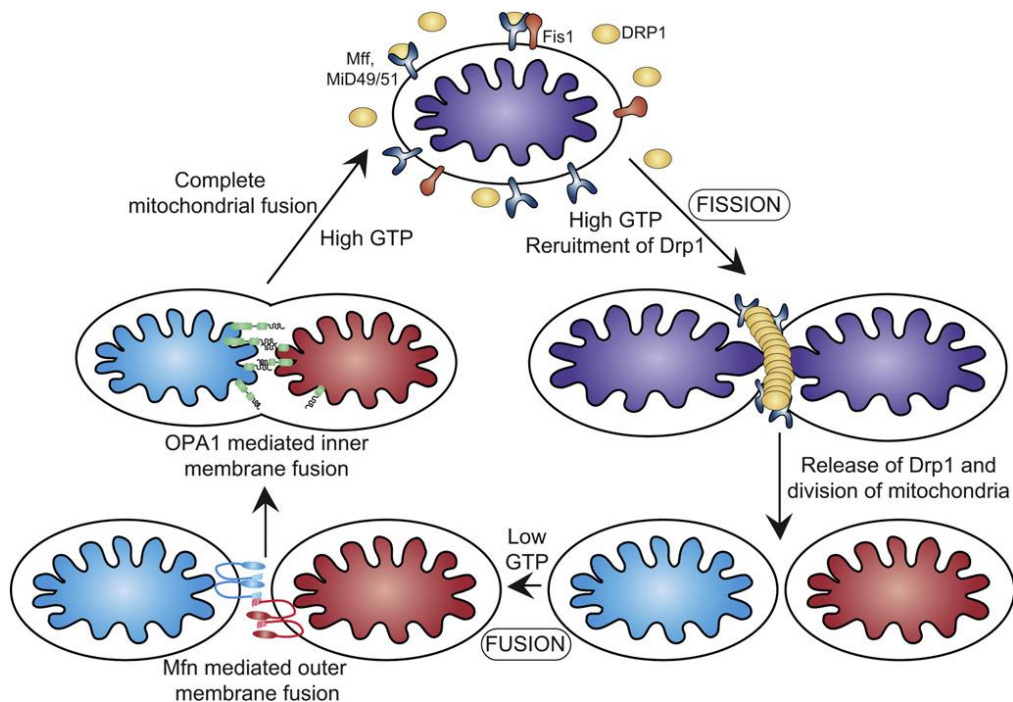




**1.3 Irudia. Egitura makroskopiko mitokondrial desberdinak.** A) Mitokondrioak neuronetan oso egitura txiki eta finak dira, bereizteko zailak direlarik. Mitokondrioek konexio asko dituen egiturak sortzen dituzte B) linfzitoetan C) astrozitoetan eta F) HeLa zeluletan. D) Kardiomioto bentrrikular heldu batean mitokondrioak lerroetan antolatuta agertzen dira zelulan zehar. E) Kultiboan dagoen kardiomioto gazte baten mitokondrioak. (Duchen, 2004)-tik hartutako irudia.

Morfologia aldaketa dinamiko honetaz gain, mitokondrioak organulu mugikorrek dira. Mugimendu mitokondrialak orain dela 90 urte deskribatu ziren lehendabizikoz eta gaur egun argi dago mugimendu hauek mitokondriaren funtzionamendu egokirako ezinbestekoak direla (Mishra & Chan, 2014). Zunden erabileraren eraginez 1980 hamarkada hasieran eta proteina fluoreszente berdearen erabileraren eraginez (GFP, ingelesetik *Green Fluorescent Protein*) 1990 hamarkada erdialdean, gaur egun badakigu mitokondrioak mikrotubuluetatik zehar oso azkar mugitu daitezkeela (Gripic & Blied, 2001). Mugimendu hauei esker, mitokondrioen kokapena

energi behar handia duten lekuetara bideratu daiteke (Boldogh & Pon, 2007) edo mitokondrioak erretikulu endoplasmaticoaren (ER) mintzetik gertu koka daitezke.



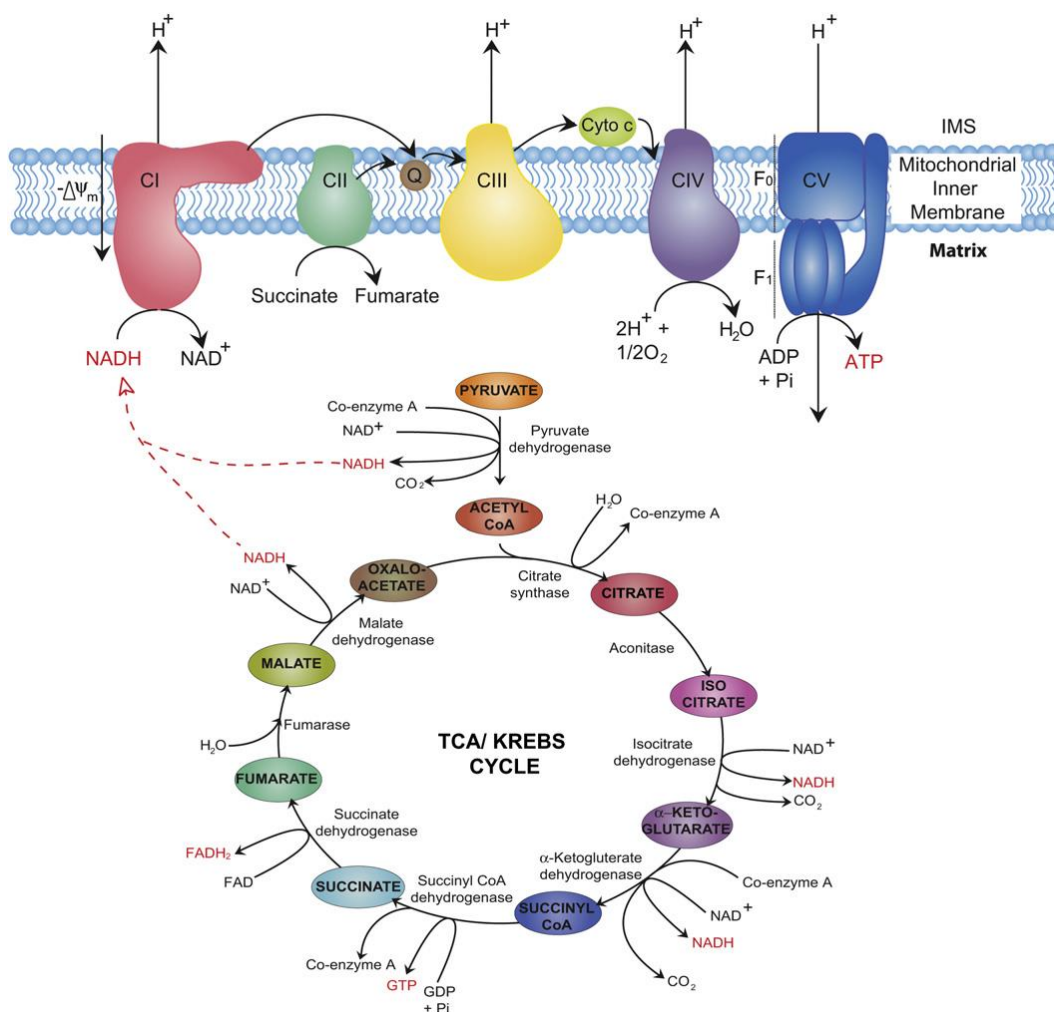
**1.4 Irudia. Dinamika mitokondrialia.** Orekan dagoen morfologia mitokondrilak fusio eta fisio prozesuen arteko oreka beharrezkoa du. (Osellame *et al.*, 2012)-tik hartutako irudia.

Mitokondrio eta ERaren arteko aposizio estuak ikusi izan dira mikroskopia elektronikoa erabilita. Bi organulu hauen arteko kontaktu estu hauek MAM izena hartzen dute (Ingelesetik *Mitochondria-associated ER membranes*) (Giorgi *et al.*, 2009; Vance, 1990). Etenik gabeko mintz hauek fosfolipido eta glikoesfingolipidoen sintesirako beharrezkoak diren entzima asko dituzte eta ER eta mitokondriaren arteko lipidoen transferentzia zuzenean laguntzen dute (Stone & Vance, 2000). MAMak  $Ca^{+2}$  ioi elkar-truke guneak ere badira, txaperonetan aberastuak daudenak, eta ondorioz MAM guneak ER eta mitokondrioren arteko  $Ca^{+2}$  seinalizazioan ere parte hartu dezakete. Legamietan, MAM guneak ER:mitokondrio estekadura konplexu batez eratuta daudela uste da. Konplexu hori bai ER bai mitokondrioko proteinez eratuta dago eta ERMES izena jasotzen du (ingelesezik *ER-mitochondria encounter structure*) (Kornmann *et al.*, 2009). Duela gutxiko ikerketa batzuek ERMES ER mintzeko Mmm1p proteinak, periferiako ER mintzeko Mdm12p proteinak eta MOMeko Mdm10p eta Mdm34p proteinek eratzen dutela iradokitu dute (Kornmann *et al.*, 2009). Ugaztunetan ez dago argi zeintzuk proteinek betetzen duten legamiaren ERMES konplexuan aurkitzen diren proteinen funtzioak. Hala ere, txaperonak bitartekotzat dituen VDAC1 proteina eta ER  $Ca^{+2}$  kanaleen errezeptore diren inositol (1,4,5)-trifosfatoa ( $IP_3R$ ) arteko interakzioak (Szabadkai *et al.*, 2006) eta baita MFN2 interakzio



azetil-coAren azetilo taldea oxaloazetatoa transferituko zaio, zitratoa sortuko delarik. Zitratoa oxaloazetato izatera pasako da zazpi pausu entzimatikoen bitartez. Soberan dagoen karbonoa bi karbono dioxido molekula bezala kanporatua izango da eta elektroiak  $\text{NAD}^+$  eta  $\text{FAD}^+$  kofaktoreetara pasako dira. Askatutako energia askea  $\text{NADH}$  eta  $\text{FADH}_2$ -k arnas kate mitokondrialera eramango dute.

Arnasketa kate mitokondrialia MIMan txertatuta dauden bost proteina konplexuek eratzen dute. Bertan, TCA ziklotik  $\text{NADH}$  eta  $\text{FADH}_2$  bidez ateratako elektroiak matritzetik IMSra protoiak ponpatzeko erabiliak izango dira, modu horretan MIMan zehar potentzial gradiente bat sortuko delarik. Gradiente hau ATPa sintetizatzen erabiliko da fosforilazio oxidatiboaren azken urratsean (Osellame *et al.*, 2012)(1.6 Irudia).



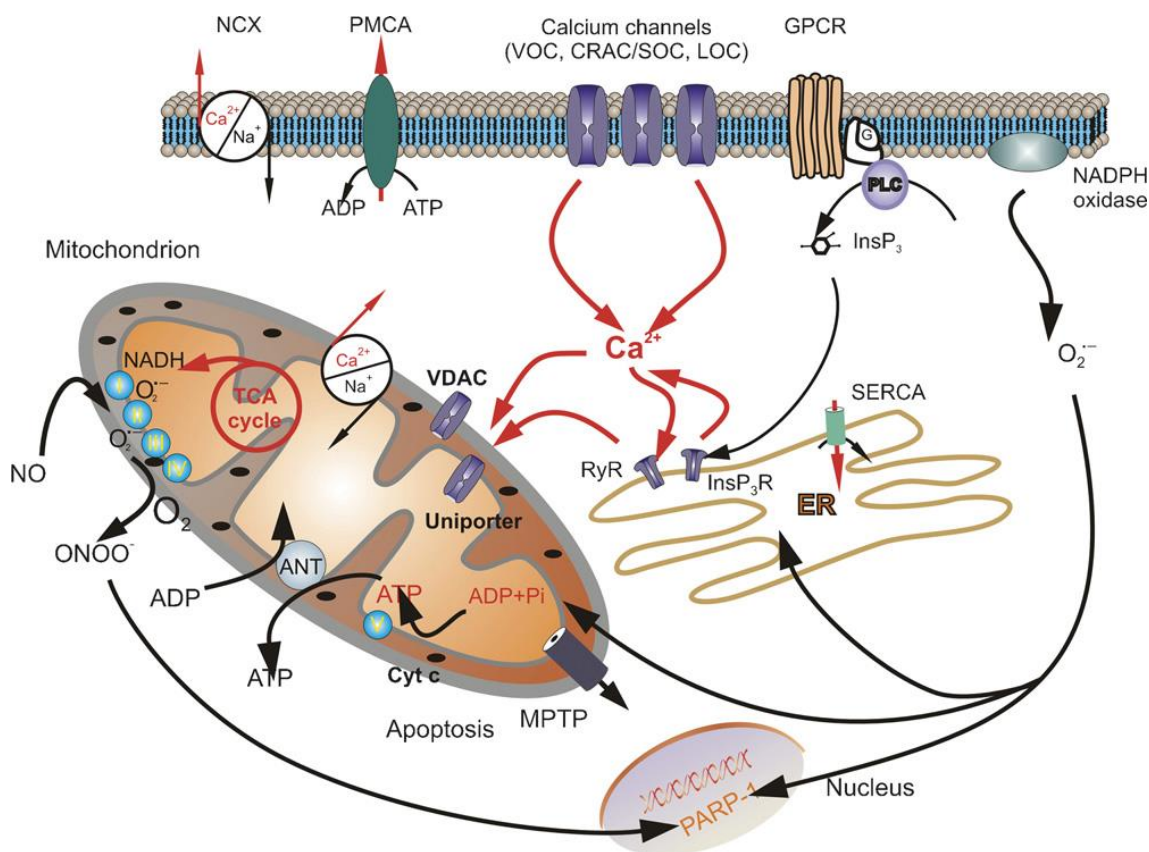
**1.6. Irudia. Elektroi garraio katearen eta TCA zikloaren eskema.** Pirubatoa  $\text{NADH}$ ,  $\text{GTP}$  eta  $\text{FADH}_2$  bezalako energia altuko molekulatan bihurtzen da. Sortutako  $\text{NADH}$  a I konplexura garraiatzen da eta  $\text{NAD}^+$  bihurtzen da. Katean zeharreko elektroi garraioak mintz potentziala mantentzen du protoiak IMSra ponpatuz. Azken urratsean V konplexuak (ATP sintasak)  $\text{ADP}$  fosforilatzen du  $\text{ATP}$  eratuz. (Osellame *et al.*, 2012)-tik hartutako irudia.

Protoien jarioa eman daiteke mintzaren boltaia ATP ekoizpenetik desakoplatzen. Jario honetaz gain, elektroiak ere elektroio garraio kateko konplexuetatik ihes egin dezakete. Elektroien askapen goiztiarrak elektroiak oxigenora zuzenean pasatzea ahalbidetzen du superoxidoa sortzen delarik. Superoxidoa oso erreaktiboa da eta zelularentzat toxikoa, estres oxidatiboaren erantzule nagusia delarik. Estres oxidatibo hau zenbait gaixotasun ekartzen ditu eta zahartze prozesuan paper garrantzitsua ere betetzen duela uste da.

Energi ekoizle nagusiak izateaz gain, mitokondrioak oso paper garrantzitsua betetzen dute  $\text{Ca}^{+2}$  homeostasia mantentzen. Mitokondriaren kaltzio sarrerak, mitokondriako mintz potentzialak eta mitokondria barruko  $\text{Ca}^{+2}$  kontzentrazio baxuak ( $[\text{Ca}^{+2}]_m$ ) eratutako gradienteak kontrolatzen dute.  $\text{Ca}^{+2}$  kontzentrazio zitosolikoa ( $[\text{Ca}^{+2}]_c$ ) handitzean,  $\text{Ca}^{+2}$  matrize mitokondrialera sartuko da, gradiente elektrokimikoak gidatuta. Ondorioz,  $\text{Ca}^{+2}$ ren mitokondriarako mugimendua mitokondriako mintz potentzialaren eta  $[\text{Ca}^{+2}]_m$ ren menpekoa da.  $\text{Ca}^{+2}$ ren sarrera MIMean kokatzen den kaltzio uniporte garraiatzaile mitokondrialaren (MCU, ingelesetik *Mitochondrial Calcium Uniporter*) bidez ematen da. Barneratu den  $\text{Ca}^{+2}$ , mintzaren birpolarizazioaren ostean mantenduko da mitokondrioan,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  trukatzailak mitokondriotik kanporatzen duen arte.  $\text{Ca}^{+2}$  gordetzeko mitokondrioak duen ahalmen honek, indargetzaile lokal bezala jokatzeko eta baita  $[\text{Ca}^{+2}]_c$ an eragina izateko aukera ematen dio mitokondrioari. Azken hau bereziki garrantzitsua da prozesu intrazelular asko  $\text{Ca}^{+2}$ rekiko sentikorrek direlako (Duchen, 2000) (1.7 Irudia).

Mitokondrioak ERTik kanporatutako  $\text{Ca}^{+2}$  seinaleak moldatzeko garrantzitsuak ere badira. Baldintza normaletan, bi organulu hauen arteko  $\text{Ca}^{+2}$  fluxu jarraia dago. Normalean,  $\text{Ca}^{+2}$  gehiena ER lumenean egoten da, baina ez da gordailu hutsa, proteinen prozesamenduaren arduradunak diren txaperonen aktibitatearen mantentzean parte hartzen du.  $\text{Ca}^{+2}$  seinalea ematen denean,  $\text{Ca}^{+2}$  ERTik zitoplasmara askatzen da eta gero berriz barneratzen da, proportzio bat mitokondriatik pasatuko delarik ERra bueltatu baino lehen (Giorgi *et al.*, 2009).

ERko  $\text{Ca}^{+2}$ aren mantentzerako makinariaren osagai molekular garrantzitsuena Inositol Trifosfato hartzaileak ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ , ingelesetik *Inositol Triphosphate Receptors*) dira. MAM gunek  $\text{IP}_3\text{R}$ tan aberastutako gunek dira eta ondorioz, ERTik mitokondriarako  $\text{Ca}^{+2}$  garraiorako “puntu bero”-tzat hartzen dira (Rizzuto *et al.*, 1998).  $\text{IP}_3\text{R}$ ek apoptosi modelo askotan parte hartzen dutela proposatu da, mitokondriako  $\text{Ca}^{+2}$  gainkargaren arduradun nagusitzat hartu direlarik. Beraz, mitokondrioan ematen den  $\text{Ca}^{+2}$  metaketak zelularen etorkizuna baldintza dezake.



1.7 Irudia. Mitokondriako  $\text{Ca}^{2+}$  seinalizazioa. (Duchen *et al.*, 2008)-tik hartutako irudia.

### 1.1.3 MITOKONDRIOAREN FUNTZIOAK HERIOTZ ZELULARREAN

$[\text{Ca}^{2+}]_m$  altuak, estres oxidatiboa, fosfato inorganikoko kontzentrazio altua, ATP ahitze eta depolarizazio mitokondriala bezalako gertaerak beste ezaugarri batzuekin konbinatuz, mPTPren (ingelesetik *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) irekiera eragin dezake. mPTP poro bat da zeinaren egitura zehatza ez den ezagutzen, baina MIMean kokatzen den ANT (ingelesetik *Adenine Nucleotide Translocator*), MOMeko VDAC (ingelesetik *Voltage Dependent Anion Channel*) eta matrizeko ziklofilina D proteinez osatuta dagoela uste dena. Azken proteina honek, ziklofilina Dk, ziklosporina Arekiko sentikortasuna ematen dio konplexuari. Baldintza patologikoetan, mPTP poroa zabaltzen da eta mitokondriako mintz potentzialaren galera, ATParen kontsumoa eta kolapso energetikoa dakar, normalean heriotz nekrotikoa eragiten duena (Duchen, 2000; Duchen, 2004; Krieger & Duchen, 2002; Osellame *et al.*, 2012).

Heriotz zelular nekrotikoan duen paperaz gain, mitokondrioek aktiboki hartzen dute parte apoptosian. Apoptosia animalia erreinu (Metazoak) osoaren funtsezko prozesua da, giza gorputz heldu baten segundu bakoitzeko milioka zelula hiltzen direlarik (Adams & Cory, 2007). Heriotz zelular mota hau garapen fisiologiko normal eta prozesu homeostatikoentzat oinarrikoa izateaz gain, infektatutako, mutatutako edo kaltetutako zelulak ezabatzeko berebiziko defentsa

estrategia ere bada (Miura, 2011). Horrekin bat etorritz, prozesu apoptotiko akastunak giza gaixotasun ugariarekin erlazionatuta daude (Adams & Cory, 2007; Strasser *et al.*, 2011).

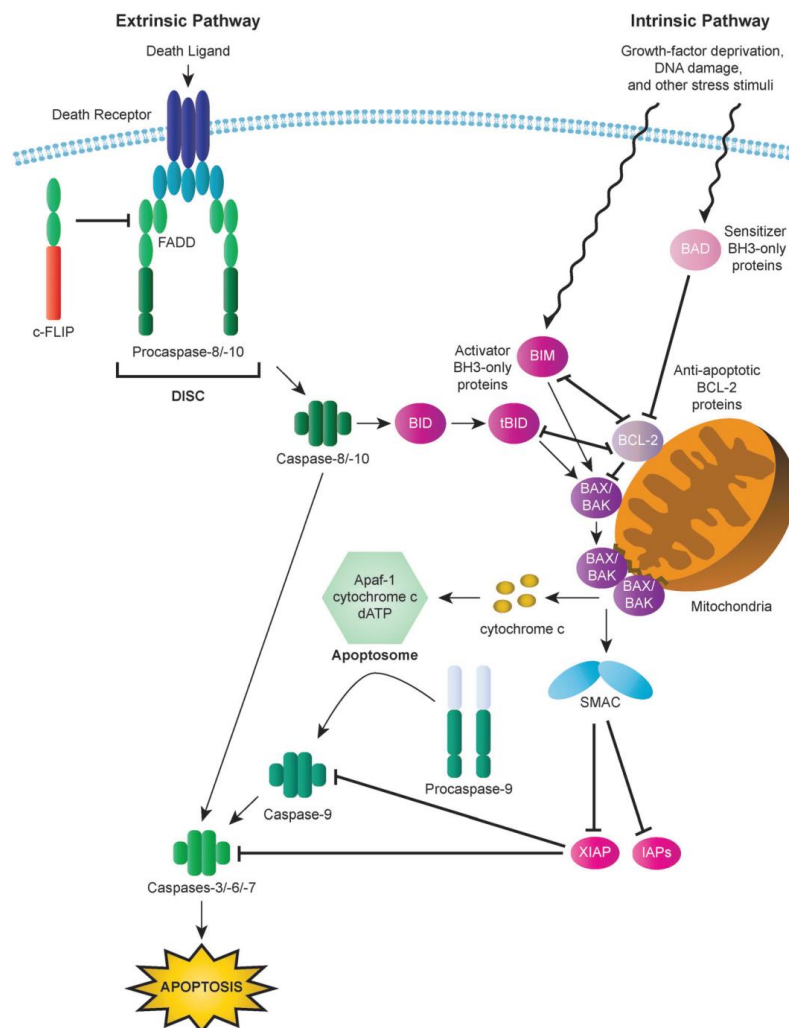
Apoptosi bidez hiltzen ari den zelula baten ezaugarriak honakoak dira: zelularen borobiltzea, zelularen bolumen galera (piknosia), nukleoaren kondentsazio eta zatiketa (Kariorrhexis), konkurren agerpena mintz plasmatikoa honen osotasuna prozesuaren azken pausuetaraino mantenduz, eta azkenik, zelula osagai desberdinen banaketa gorputz apoptotikoetan. Guzti honetaz gain, zelula apoptotikoen beste bereizgarri bat fosfatidilserinaren (PS, ingelesetik *Phosphatidylserine*) mintz plasmatikoko lipido geruza bikoitzaren kanpo mintzerako translokazioa da. Prozesu hau fagozitoak erakartzeko seinale gisa erabiltzen da eta ondorioz, zatiki zelularrak desagerrarazteko (Kroemer *et al.*, 2005, 2009). Modu honetan azken eginbide honek zelula apoptotikoen ezabatze eta garbiketa azkar bat eragingo du, inguruko ehunen hantura eta erantzun immunearen aktibazioa eragotziz (Bever & Williamson, 2010; Elliott & Ravichandran, 2010; Lauber *et al.*, 2003).

Ornodunetan, apoptosia bi bide nagusi jarraitu ditzakeen genetikoki zehaztutako mekanismoa da: alde batetik “bidezidor estrintsekoa” edo heriotza hartzaileen bidezidorra ere deitutakoa aurkituko dugu; bestetik, “bidezidor intrintsekoa” edota mitokondrioaren bidezidorra deitutakoaren bidez eman daiteke (1.8 Irudia).

Bidezidor estrintsekoa, TNF superfamiliako heriotza zelulaz-kanpoko seinaleek (adib. TNF  $\alpha$ , Fas/CD95-L, TRAIL...) dagozkien hartzaileak (TNF 1 hartzailea (TNFR1), Fas, TRAIL hartzailea (TRAILR1 eta TRAILR2)) batzean abiatzen da (Fulda & Debatin, 2006; Lavrik *et al.*, 2005; Walczak & Krammer, 2000).

Ornodunen artean apoptosi mota ohikoena bidezidor intrintsekoa edo mitokondriala da (Green & Kroemer, 2004). Prozesu honen aktibatzaileen artean estres kinada anitz aurkituko ditugu, esate baterako, ultramore eta gamma erradiazioak, beroa, faktore birulentoak, hazkuntza faktoreen gabezia, DNAREN kalteak, estres oxidatzailea eta faktore onkogeniko zehatz batzuen aktibazioa (Plati *et al.*, 2011). Zitosolekoak edo organulu barrukoak diren molekula ugari estres kinada hauek detektatzeko eta seinale egokia mitokondriora bideratzeko gai dira, azkenik mitokondriako kanpo mintzeko iragazkortasuna (MOMP, ingelesetik *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) eraginez (Green & Kroemer, 2004). MOMP bidezko bidezidor intrintsekoak jarraian zerrendatuko diren ezaugarri berezi batzuk aurkezten ditu: mintz potentzialaren ( $\Delta\Psi_m$ ) galera, apoptosi-eragileak diren faktoreen askapena (c-zitokromoa, SMAC/Diablo, OMI/HtrA2, AIF, Endo G...) mitokondrioen mintzen arteko eremutik zitosolera eta arnasketa katearen inhibizioa (Petit *et al.*, 1995). MOMP prozesua itzulezina izanik, erregulazio maila oso altu baten pean ematen da, honen arduradun nagusienak BCL2 familiako proteinek direlarik. BCL2 familiako proteinek elkarrekintza-sare konplexu bat eratuko dute bai beraien

artean zein bestelako faktore zelularrekin, modu honetan zelula MOMP bidezko apoptosia jarraituz hiltzen den ala ez zehaztuz (Chipuk *et al.*, 2010; Youle & Strasser, 2008).



**1.8 Irudia. Apoptosiaren bidezidor estrintsekoa eta intrintsekoa.** Bidezidor estrintsekoan, heriotzaren hartzaileek beraien ligandoak batzerakoan, DD domeinua (ingelesetik *Death Domain*) duten proteinak erakartzen dituzte (FADD gisa adierazita), DISC suprakonplexuaren osagaiak diren 8- eta 10-prokaspasak. Orduan, 8 eta 10 kaspasek kaspasa exekututzaileen (3, 6 eta 7 adib.) aktibazioa eragiten dute, apoptosia gertaraziz. Bestalde, 8-kaspasaren aktibazioak BH3-domeinu bakarreko BID proteina moztu dezake, tBID sortuz, heriotza seinalea bidezidor intrintsekora bideraraziz. Bidezidor mitokondrial edota intrintsekoan, MOMPak mitokondriotik c-zitokromo eta apoptosi-eragileak diren beste faktore batzuen zitosolerako askapena eragiten du; ondoren, zitolosean apoptosoma osatzen da, 9-kaspasak kaspasa exekututzaileen segidako aktibazioa eraginez. Honez gain, BCL2 familiako proteinek estuki erregulatzen dute MOMPa. BH3-domeinu bakarreko proteinek (BIM eta tBID proteinak *aktibatzaileen* ordezkari bezala daude, eta BAD, ordea, *sentikortzaileen* ordezkari) apoptosia aktibatzen dute. BCL2 moduko proteinek (BCL-2 proteina ordezkari bezala egonik), berriz, apoptosia inhibitzen dute BAX/BAK-en aktibazioa eragotziz. (Plati *et al.*, 2011)-etik hartutako irudia.



Cyt c proteina txikiak (12 kDa) mitokondrioaren barne-mintzean aurkitzen den kardiolipina (CL, ingelesezik *cardiolipin*) lipido mitokondrialari modu ezegonkor batean batzeko gaitasuna aurkezten du. Behin CL oxidatu eta mitokondrioia permeabilizatzen denean, cyt c zitoserara barreiatua izan daiteke bertan apoptosomaren eraketa bultzatuz. Cyt c, APAF-1, 9-kaspasa eta ATP/dATP osagaiak apoptosoma proteinadun plataforma eratuko dute, bertan 9-kaspasa aktibatuz eta jarraian segidako kaspasa aktibazioak eraginez (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996; Ott *et al.*, 2002; Saelens *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 1997). Honez gain, MOMPak beste hainbat proteina askatuko ditu zitoserara, SMAC/DIABLO (25kDa) eta Omi/HtrA2 (37kDa) hain zuzen ere. Proteina hauek IAP proteinak batu eta neutralizatzeko gaitasuna aurkezten dute, modu honetan kaspasen aktibazioa faboratuz; bestalde, euren aktibitate proteolitikoa dela eta, kaspasekiko independentea den zelulen heriotzean ere parte hartzeko aukera izango dute (Saelens *et al.*, 2004). Azkenik aipatuko diren bi apoptosi-eragileak diren proteinak AIF (62 kDa) eta Endo G (23 kDa) deiturikoak dira. Behin zitoserara askatuak direnean, bi proteina hauek nukleora translokatzeko ahalmena azaltzen dute kromatinaren kondentsazioa eta DNAREN zatiketa burutuz (Daugas *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999).

Proteina hauen IMS-tik zitoserako askapen-denbora eztabaida iturri da gaur egun, zelula motaren arabera apoptosi-eragileak diren faktoreen birbanaketa-orden ezberdinak aurkitu baitaitezke; modu honetan, hainbat ikerketa lanetan, cyt c, SMAC/DIABLO eta AIF-ren askapen-denbora desberdinak deskribatu dira (Arnoult *et al.*, 2002; Daugas *et al.*, 2000). Hala ere, beste ikerketa batzuek cyt c eta SMAC/DIABLO batera askatzen direnaren alde egiten dute (Muñoz-Pinedo *et al.*, 2006; Rehm *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005). Ezberdintasun hauek proteinek mitokondriora atxikitzeke aurkezten dituzten mekanismo desberdinetan oinarrituz azaldu daitezke. C-zitokromoari dagokionez, zitoserara askatua izan dadin, barne mintzean dauden gangar mitokondrialen birmoldaketa eman behar da bertan harrapatuta aurkitzen baita c-zitokromo gehiena (Scorrano *et al.*, 2002). Ondoren, kardiolipinarekin daukan lotura hautsi beharko du (Ott *et al.*, 2002). AIF-ren kasuan, aldiz, kaspasa bat ez den proteasa baten bidezko barne-mintzarekiko duen ainguraketaren mozketak jasan behar du. Bukatzeko, mitokondrioaren apoptosi-eragileak diren faktore hauen askapen-denboretan ikusitako ezberdintasunak, mitokondrioaren kanpo mintzean eratu daitezkeen poroen tamaina desberdinek eragindako hautakortasunari egotzi ahal zaizkiola esan beharra dago (Saito *et al.*, 2000).

Mitokondrioaren bidezidorrean emandako akatsek minbizi zelulei bizirauteko abantailak eskeintzen dizkie eta minbizi zelulek kimioterapia eta erradioterapiari izaten dieten erresistentzian ere badu eragina.

### 1.1.3.1 Apoptosiarekin erlazionatutako lipidoen eginkizunak heriotz zelularrean

Mitokondrioaren lipido konposaketak aldaketa gutxi jasaten ditu zelula mota desberdinen artean, beraz, aldaketa asko ezin ditzakeela onartu pentsa liteke. Baldintza arrunten menpean, legami eta ugaztunen mitokondrioen mintzen lipido konposaketa zehaztua izan da, eta deskribatutako ezberdintasunak saioetan erabilitako baldintza ezberdinei egotziak izan dira (1.11 Irudia) (Fleischer *et al.*, 1967; Osman *et al.*, 2011; van Meer *et al.*, 2008).

Apoptosian zehar MOMak mota desberdinetako lipidoak pilatzeko gaitasuna dauka. Gero eta argiago dago, MOMean dauden lipidoak egiturazko osagaiak izateaz gain, proteina mitokondrial espezifikoen (BCL2 familiako proteinak barne) funtzioan ere eragina izan dezaketela, bai lipidoarekin interakzio zuzen baten bidez zein MOMaren lipido geruza bikoitzaren ezaugarri fisikoak moldatuz.

- Glizerofosfolipidoak

Mitokondrioan dauden glizerofosfolipidoen artean zelulen heriotza apoptotikoan eginkizunik nabarmenena duena CL da, berau mitokondrioaren lipido bereizgarriena izanik. Ebidentzia ezberdinek apoptosian zehar MOMaren CL kantitatea handitu egiten dela adierazten dute. Fosfolipidoen garraioa MOM eta MIM artean bi mintz hauen arteko CS elkarguneen bidez ematen dela proposatua izan da. Nahiz eta oraindik CLren translokazioa eragiten duen mekanismoa zehaztu gabe egon, proteinen mintza birmoldatzeko edo mintzaren elkargune horietan CL berrantolatzeke, mitokondrioaren fosfolipidoen 3-eskrablasa (PLS3) (Liu *et al.*, 2003), kinasa mitokondrialak (Epand *et al.*, 2007), eta BCL2 familiako proteina zehatz batzuek, tBID alegia, duten gaitasunean oinarrituz prozesu honetan inplikaturik daudela zehaztua izan da (Degli-Esposti *et al.*, 2001). Izan ere, CL tBID proteinaren hartzaile gisa aritzen zela azaltzen zuen lanarekin deskribatu zen lehendabizikoz lipido honek apoptosiaren aktibazioarekin duen lotura (Lutter *et al.*, 2000).

Lipido hutsezko mintz-ereduetan, CLk dosi-menpekotasun bat jarraitzen duen tBIDen batuketa eragiten du. Tenperaturarekiko sentikorra den CL sintasa baten genea daukaten zelula lerroetan, tenperatura aldaketen ondorioz lortutako CL kontzentrazio baxuek tBIDen mintzerako translokazioa eragotzi dezakeela ikusi da (Lutter *et al.*, 2000). Ondoren, mitokondrioen frakzionamenduaren tomografia immunoelektroniko bat aztertuz, tBID CS gunetara lehentasunez batzen dela ikusi da (Lutter *et al.*, 2001). Bestalde, tBID sortzen duen 8-kaspasa entzima proteolitikoak, CLrekin elkarrekintza zuzenak dituela ikusi da, bertan bideratuko du BID proteinaren mozketak (Gonzalez *et al.*, 2008).

Bestalde, BCL2 familiako proteina birkonbinatuak eta lipido sintetikoetatik eratutako besikulaz osatutako *in vitro* sistemetan egindako saioetan oinarrituz, BAX-moduko proteinak

kardiolipinadun mintzetan modu eraginkorrago batean txertatu eta oligomerizatzen dutela behatu da (Kuwana *et al.*, 2002; Landeta *et al.*, 2011; Terrones *et al.*, 2004). Emaizta hauen ildo berean, CL mitokondrialaren degradazioak aktibatutako BAXek eragindako c-zitokromoaren askapena eragozten du (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008). BAKen kasuan, CLrekin ematen den interakzio espezifikoak BAK $\Delta$ C birkonbinatuan berregituraketa lokalizatua dakar, tBIDekin emango den interakzioa ahalbidetuz (Landeta *et al.*, 2011). Honek CLk izango lukeen paper goiztiarra iradokitzen du, BAKen aktibazioa ekarriko lukeena.

Beste ikerketa batzuek, BAX oligomerizazio eta bikapa lipidiko insertzioan, CL kopuru handiek laguntzen dutela iradokitzen dute, mintzaren elastikotasunaren handipen edota CLaren kate aziliko insaturatuek eragiten duten kurbatura intrintsekoa dela eta (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008). Baina hala ere, BAX-motatako proteinek CLrekin duten interakzioaren oinarria argitzeke dago.

CLren mota ezberdinetako aldaketak apoptosiarekin izan dira erlazionatuak. Adibidez, CLren peroxidazioak c-zitokromoa eta MIMaren arteko loturaren apurtzea eragiten du, modu honetan, mintzarteko gunean c-zitokromoaren erreserba bat aske geratuko da, behin MOMP eraginda zitostolera askatua izan daitekeena (Kagan *et al.*, 2005). CL peroxidatuak BAXek bideratutako liposomen zulatzea sustatzen du, badirudi mintzaren kurbaduran aldaketak eragitearen bidez (Marí *et al.*, 2008). Apoptosian zehar, mitokondrioan CLren produktu metabolikoa den monolisokardiolipina (MCL), metatzen da; honek tBIDekin interakzionatzeko gaitasuna dauka mintzaren kurbadura erdietsiz (Degli-Esposti *et al.*, 2003).

MOMP gertatu baino lehen, mitokondrioan pilatzen diren beste bi glizerolipido, mintz kurbadura eragiteko gaitasuna daukaten lisofosfatidilkolina (LPC) eta diazilglizerola (DAG) dira. Frogatua izan den moduan, bai LPC zein DAG lipidoak BAXen mintz-iragazkortze funtzioan eragina izan dezakete poro proteolipidiko eraketarako joera energetikoa modulatzuz (Landeta *et al.*, 2011; Terrones *et al.*, 2004).

- Esfingolipidoak

Gaur egunera arte, esfingolipidoen inguruan burututako lanak glikoesfingolipido eta esfingomielina moduko esfingolipidoen biologia argitzeko xedearekin egin izan dira. Glikoesfingolipidoek eta esfingomielinak zelulen arteko lotura eta seinaleen transdukzioaren moduko hainbat prozesuetan parte hartzen dute. Jatorriz bitartekari metabolikoak direla pentsatu izan den arren, zeramida (CER), esfingosina eta esfingosina-1-fosfato (S1P) lipidoek zelulen ugaritze, ezberdintze eta migrazio prozesuen erregulazioan eginkizun fisiologiko nabarmenak dituztela ikusi da, baita minbizi, endekapenezko gaixotasun neurologiko,

gaixotasun autoimmune edota angiogenesiaren patobiologiaren erregulazioan ere (Van Brocklyn & Williams, 2012) .

CER eta erlazionatutako glikolipidoak MOMaren osagai gutxienekoak izanda ere apoptosian inplikaturik daudela ezagutarazi da (Goonesinghe *et al.*, 2005; Sandra *et al.*, 2005; Siskind, 2005; Maurizio Sorice *et al.*, 2009). Zeramidaren maila seinale apoptotiko ezberdinen (TNF $\alpha$ , FAS ligandoa edo DNAn kalteak) ondorioz handitzen dela ezaguna da, baita zeramidaren produkzio hau apoptosiaren makinarria osoa aktibatzen baino lehenago gertatzen dela ere. CER aldaketa bioenergetikoetan, ROSen ekoizpenean eta MOMaren iragazkortasunean ere inplikaturik dagoela argitaratu da (Birbes *et al.*, 2001; Colombini, 2010; Siskind, 2005). Nahiz eta modelo hau ez dagoen oso onartua, zeramidak MOMP prozesuan izan lezakeen parte hartzea lipido honek era ditzakeen kanaletan oinarritzen da (Siskind *et al.*, 2002; Siskind, 2005; Stiban *et al.*, 2006).

BCL2 familiako proteinei dagokionez, mekanismo honen xehetasun zehatzak eztabaidatuak izaten jarraitzen duten arren, hauek zeramidaren ekoizpena, BAXen mitokondriarako translokazioa eta BAX/BAKek bideratutako MOMP bultzatzen dutela proposatu da (Birbes *et al.*, 2005). Beste aukera bat, CER eta BAXen artean apoptosi-eragileak diren proteinen zitosolerako askapena baimentzen duen kanal bat eratzea izan liteke (Ganesan & Colombini, 2010). BAKek, baina ez BAXek, CER sintasa aktibatzen duela iradokitu da; modu honetan, BAKek CER mailak handituko lituzke eta CER molekula horiek BAX/BAKekin batera kanal bat eratuko lukete MOMean (Beverly *et al.*, 2013; Siskind *et al.*, 2010). Hortaz, BAX eta BAKek bai apoptosian zein metabolismoan erredundantea ez den funtzioa dutela argia da.

Bestalde berriki ezagutarazi da BAX-moduko proteinek elkarlanean, zeramidaz gain, esfingolipidoen beste metabolito batzuk aritu daitezkeela MOMP eragiteko. Hain zuzen ere, erretikuluan lokalizatutako CER mitokondriora garraiatzen denean, S1P eta hexadezenala ekoizten dira, BAK eta BAXen aktibazio funtzionalean eraginez hurrenez hurren (Chipuk *et al.*, 2012). Bakartutako mitokondrioetan egindako esfingolipidoen eraketan parte hartzen duten entzimen inhibitzaile farmakologikoetan oinarritutako saioretan, mitokondriarako espezifiko den esfingosina kinasa-2 (S1Paren ekoizlea) eta S1P liasa (hexedezenalaren ekoizlea) izeneko entzimek, hurrenez hurren BAK eta BAXek bideratutako apoptosia kitzikatzen dutela proposatu da.

Azkenik, apoptosiarekin erlazionatuta dauden esfingolipidoen azken taldea gangliosidoena da. Zelula lerro ezberdinetan CER euskarri moduan duen GD3 glikolipidoa mitokondrioan pilatzen da CER edo TNF $\alpha$  kinaden erantzun gisa, honek apoptosiaren bidezidoreean lagundu dezakeela proposatuz. Izan ere, GD3 lipidoa zelula osasuntsuetara modu exogeno batean gehitzeak, kaspasen aktibazioa eragin dezake, baita bakartutako mitokondrioetara gehitzerakoan zitosolaren askapena eragin ere .

- Kolesterola

Kolesterola (CHOL, ingelesetik *cholesterol*) mintz biologikoen funtzioan eta ezaugarri fisikoetan eginkizun garrantzitsua duen lipidoa da. MOMean, CHOL/fosfolipido masa erlazioa %3 eta %24 artean mantentzen da, zelula tumoral desberdinen mitokondrioek CHOL maila handiagoak erakusten dituzten arren (Baggetto *et al.*, 1992; Crain *et al.*, 1983). Mitokondrioan kokatzen den CHOL, berriki MOMP eta zelulen heriotzaren faktore erregulatzaile garrantzitsu bezala agertzen ari da (Garcia-Ruiz *et al.*, 2009).

Kolesterolaren efektu antiapoptotikoak azaltzeko mekanismo desberdinak proposatu dira. Hasteko, kolesterolaren maila altuak mitokondrioak prozesu ezberdinetatik babesten ditu, adibidez, mitokondrioaren hantura handi batetik eta barne mintza zeharkatzen duten protoien askapenetik (Graham & Green, 1970); gainera, mintz mitokondrialetan kokatzen diren eta apoptosiarekin erlazionatuta dauden proteina ezberdinen aktibitatea modula dezake baita ere (Colell *et al.*, 2003). Bigarrenez, kolesterolak BAXen bai mintzerako txertaketa zein oligomerizazioa inhibitu ditzake, BAXek bideratutako *c*-zitokromoaren askapena atzeratuz (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008; Montero *et al.*, 2008), bai lipidoen alboko antolaketa aldatuz bai mintzaren ezaugarri elastikoak moldatuz (Garcia-Ruiz *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2008). Eredu hau sostengatuz, CHOL lipidoak mintz mitokondrialetan mikrodomeinu ordenatuak eratzeko gaitasuna duela ezaguna da, hau BCL2 familiako proteinen funtzioekin eta apoptosiaren erregulazioarekin erlazionatu izan delarik (Garofalo *et al.*, 2005). Bestalde, BAXen kasurako  $\alpha 5$  helizean dauden 113-119 hondarren arteko zatikian kokatzen den CHOL ezagutzeko aminoazido adostasun sekuentzia (CRAC, ingelesetik *CHOL Recognition Amino acid Consensus*) bat proposatu da, baita mitokondrioan kolesterolaren murrizteak BAXen inhibizioa eragiten duela ere (Martínez-Abundis *et al.*, 2011). Bukatzeko, CRAC domeinua oso gutxi kontserbatzen den sekuentzia dela kontuan hartzea beharrezkoa da ere, baita, BAKen kasurako ez dela CRAC domeinurik aurkitu.

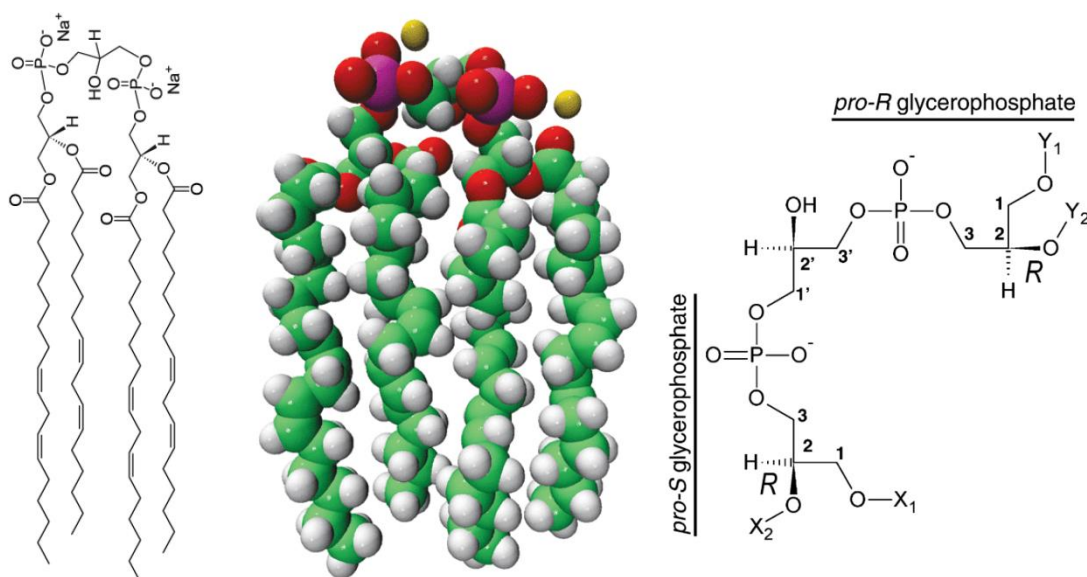
### 1.1.4 KARDIOLIPINA

CL mintz mitokondrialen osagai lipidiko espezifikoa da. Bere izenak 1942. urtean lehendabizikoz isolatu (Pangborn, 1942) zeneko ehunari, hots bihotzari, egiten dio erreferentzia. Hala ere, ugaztunetan edozein ehunean aurki daiteke. CL fosfolipido azpitalde baten partaide da, poliglizerofosfolipidoena hain zuzen ere. Fosfolipido talde honetako kideen isatsak eta buru polarrak fosforil eta glizerol zatikien errepikapenez eraikiak daude. Talde honetako ezaugarri interesgarrienetako bat hidroxilo talde askoren presentzia da, zeintzuk aziloak gehitzeko guneak izan daitezken isomer posizional eta esteriko desberdin asko sortu daitezkeelarik (Schlame *et al.*, 2000).

CL parekorik ez duen fosfolipidoa da hiru arrazoiengatik gutxienez. Lehenengoa, MIMean aurkitzen da ia modu eksklusiboan, hau da, sortua izan deneko lekuan. Ondorioz, biosintesi gunean mantentzen da, honek adierazten du CL konpartimentu honentzat berebiziko garrantzia duela. Bigarrenik, CL glizerol batez lotutako bi fosfatidil hondarrez osatutako lipido dimeroa da. Horren ondorioz, bi fosfato buru eta lau kate aziliko ditu. Hirugarrenik, CL fosfolipido egitura da, hau da, egitura lamelar eta hexagonalak eratzeko gaitasuna du.

### 1.1.4.1 Egitura

Arestian aipatu den bezala, CL glizerol talde zentral batek elkartutako bi fosfatidil unitatez osatutako fosfolipidoa da (1.9 Irudia). Bi fosfatidil zatikiak estereokimikoki ez-baliokideak dira, bietako bat glizerol loturaren karbono atomo zentralarekiko *pro-R* eta bestea *pro-S* posiziotan kokatuta daudelako. Bi talde fosfatoen presentziak bi karga negatibo ematen dizkio, proteinen interakziorako garrantzitsua izan daitekeena (Schlame, 2008).



**1.9 Irudia. Kardiolipinaren egitura.** Molekula glizerol talde batek lotzen dituen bi sn-glizero-3-fosfato zatikiez osatuta dago. Lau talde aziloak ( $X_1, X_2, Y_1, Y_2$ ) glizerofosfatoetara lotuta daude. Glizerofosfato biek zentro kiralak R konformazioan dituzte. Glizerol zentralak zentro prokiralak ( $X_1=Y_1$  eta  $X_2=Y_2$  izanez gero) edo benetako zentro kirala ( $X_1 \neq Y_1$  eta  $X_2 \neq Y_2$  izanez gero) izan dezake. Honen ondorioz, bi glizerofosfatoek posizio estereokimiko desberdinak hartzen dituzte. [avantilipids.com](http://avantilipids.com) eta (Schlame & Ren, 2006)-tik hartutako irudia.

CL espezie molekularrak lau kate azilikoaren permutazioen ondorio dira. Eukariotoetan aurkitzen den CLak gantz azido patroia bakarra du, funtsean  $C_{18}$  kateetara mugatuta dagoena. Hala ere, *Saccharomyces cerevisiae* legamian salbuespen bat aurki genezake, bertako CLk oleoil (18:1) eta

palmitoleoil (16:1) hondarren kantitate berdinak dituelako. Ugaztunen kasuan C<sub>18</sub> kate nagusia linoleoil (18:2) motakoa da. Aitzitik, bakteriotan CLk 14-18 karbono atomoz osatuta dago eta saturazio maila altua izaten du (Schlame *et al.*, 2000).

CLk polimorfismo bereizgarria erakusten du, egitura mizelar, lamelar eta hexagonalak eratzeko gai delarik. Mizelatik lamelarako eta lamelatik egitura hexagonaletarako fase trantsizioak katioi dibalenteen presentziak, pH baxuak, indar ioniko altuak eta azil talde askoren presentziak faboratzen dituzte. Buru polarren kargak fase aldaketetarako duten garrantzia nabaria da, izan ere indar ionikoak eta pHak egitura hexagonalak eragiten baitituzte. Beste faktore erabakigarria isats hidrofobikoaren bolumena da. Esaterako, dilisokardiolipinak, bakarrik bi kate aziliko dituenak, egitura mizelar eta lamelarrak eratuko ditu, azilkardiolipinak aldiz, CLrekin konparatuz kate aziliko estra bat izanik, beti egoera hexagonalean aurkitzen da. CL egoera lamelar zein hexagonalean egon daiteke. CL hexagonalak mintzen arteko kontaktu guneetan eta bikaparen egitura asaldatuta dagoen guneetan eginkizunen bat izan dezake, berregituraketa prozesuetan ere parte hartu lezake (Ortiz *et al.*, 1999). CL gehiena bigeruzaren baten egoeran existitzea da probableena. Egoera honetan, bi fosfatidil glizerolak bigeruzaren gainazalareriko perpendikularki orientatuta egongo dira. Glizerol talde zentrala, ur/mintz interfasean dagoena, bigeruzaren gainazalarekiko paraleloki kokatuta egongo da (Schlame *et al.*, 2000; Schlame, 2008).

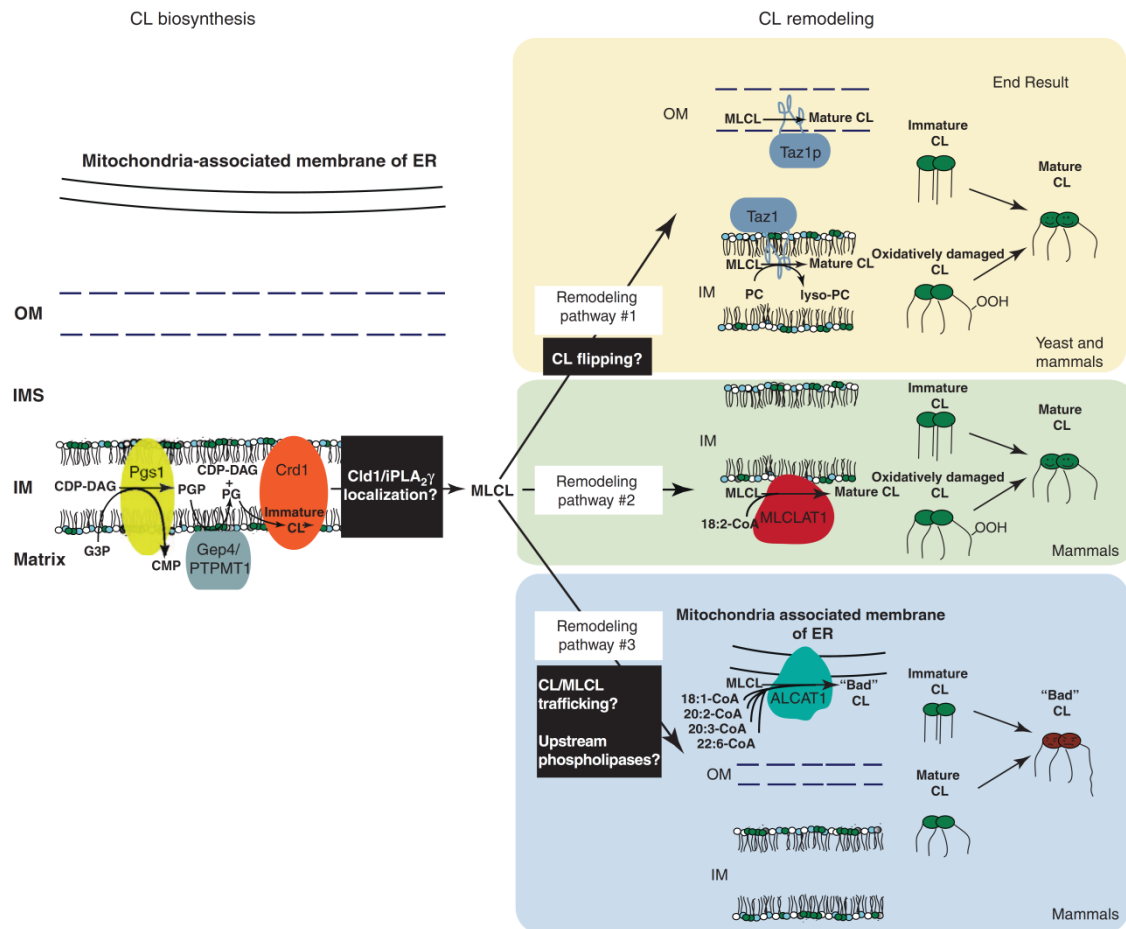
#### **1.1.4.2 Biosintesia eta degradazioa**

CLren biosintesia glizerol-3-fosfato eta aktibatutako gantz azidoetatik azido fosfatidikoaren eraketarekin hasten da. Ondoren, azido fosfatidiko honek CTPrekin erreakzionatuko du energia handiko bitartekari den CDP-diazilglizerola eratuz, erreakzio hau CDP-diazilglizerol entzimak katalizatuko du. Entzima hau ERan kokatuta dago, baina mitokondrioan ere aurkitu daiteke. Aktibatutako fosfatidil taldea glizerol-3-fosfatoaren sn-1 hidroxil taldera pasatuko zaio fosfatidilglizerolfosfatoa (PGP) sortuko delarik. PGParen eraketa katalizatzeke arduraduna fosfatidilglizerolfosfato sintasa (Pgs1) entzima da. Behatu izan da, entzima hau kodetzen duen genearen delezioa ez dela letala, baina mitokondriaren funtzioa estutasunean jartzen du. Gero, PGP defosforilatua izango da fosfatidilglizerola eratuz, entzima arduradunak fosfatidilglizerolfosfatasak direlarik. Entzima hauek legamietan Gep4 eta ugaztunetan PTPMT1 dira. MIMaren alde zitoplasmatikoa ainguratuta daude bi entzima hauek. Entzima hauen galerak PGParen metaketa dakar, arnasketa katearen superkonplexuak desegonkortuz eta hazkuntza zelularra gutxituz. Puntu honetatik aurrera bidezidorra bi adarretan bananduko da, alde batetik prokariotoen adarra eta bestetik eukariotoena. Prokariotoetan, fosfatidilglizerolak beste fosfatidilglizerol batetik datorren fosfatidil talde bat jasoko du transesterifikazioz, fosfolipasa-D motako entzima den CL sintasa (Crd1) bakterianoak katalizatuta. Entzima hau

MIMean kokatzen da. Crd1 bakterianoa kontrako norantzan ere funtziona dezake, CLren deskonposizioa ekarriko lukeena. Beraz, CLren sorreran entzimaren adierazpen mailak ez ezik beste faktore batzuk ere eragina izango dute prokariotoetan. Eukariotoetan, fosfatidilglicerolak fosfatidil-CMPtik datorren aktibatutako fosfatidil talde bat jasoko du, fosfatidiltransferasa den CL sintasa entzimak katalizatuko duelarik erreakzioa. CL sintasa kodetzen duten geneak identifikatu izan dira eta euren produktuak karakterizatu *S.cerevisiae*-n (Chang *et al.*, 1998), *A.thaliana*-n (Katayama *et al.*, 2004) eta gizakietan (Chen *et al.*, 2006; Houtkooper *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). Entzima hauek guztiak MIMaren matrize aldera joango dira euren N-terminaleko presekuentziaz gidatuta eta bere funtzio egokirako  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , edo  $Co^{2+}$  bezalako katio dibalenteen presentzia eta 8-9ko PHa beharrezkoa dute. Fosfatidil-CMParekiko espezifitate handia dute adenosina, guanosina edo uridina analogoekin konparatuz gero. Kardiolipina sintasa entzimak ez dauka tetralinoleoil-CL eratzeko beharrezkoa den espezifitate azilikorik, honek iradokitzen du ondoren gertatuko den birmoldaketa CL heldua lortzeko ezinbestekoa dela (Claypool & Koehler, 2012; Horvath & Daum, 2013; Schlame, 2008) (1.10 Irudia).

CLren sintesia kate azilikoaren segidako birmoldaketarekin osatzen da. Prozesu honek gehienetan lau kate aziliko identiko dituen CL eratzeko du. CLren forma espezifikoa hau ezin da *de novo* bidezidorraren bidez sintetizatu, CL sintasak duen sustrato espezifitate falta eta CL eta lipido aintzindarien arteko desberdintasunak direla eta. Ondorioz, birmoldaketa CL heldua lortzeko nahitaezko prozesua da (Schlame, 2008).





**1.10 Irudia. CLren biosintesi eta birmoldaketa prozesuen laburpena. (Claypool & Koehler, 2012)-etik hartutako irudia.**

CLren birmoldaketa fosfolipasa batek CLren kate aziliko bat kentzen hasiko du, monolisokardiolipina eratuko delarik. Erreakzio hau aurrera eramaten duen entzima legamietan kardiolipin deazilasa (Cld1) (Beranek *et al.*, 2009) eta ugaztunetan kaltzioarekiko independentea den iPLA<sub>2</sub>γ izan daitekeela proposatu da (Mancuso *et al.*, 2009). Monolisokardiolipinatik CLren eraketa hiru proteinek erdietsiko dute tafazzinak (Taz1), monolisokardiolipin aziltransferasak (MLCLAT1) eta azil-CoA:lisokardiolipin aziltransferasa-1-k (ALCAT1). Hiru entzima hauek monolisokardiolipinari kate aziliko bat gehitzeko gaitasuna dute. Hala ere, CLren birmoldaketa partehartzaile zuzena tafazzina dela iradokitzen duten ebidentzia argiak dauden bitartean, MLCLAT1 eta ALCAT1 entzimek prozesu honetan burutzen duten funtzioa ez dago guztiz argi (Claypool & Koehler, 2012).

Legamietako tafazzina, Taz1, MIM eta MOM mintzekin asoziatuta dago mintz arteko gunean kokatuta. Lau kate azilikoak birmoldatzeko gai den transzilasa da Taz1, aurreranzko eta atzeranzko transzilazio bidez burutzen duena. Taz-1-ek egiten duen CLren birmoldaketa mintz arteko genetika hurbil dauden mintz geruzetan gertatzen dela pentsatzen da, eta CLren

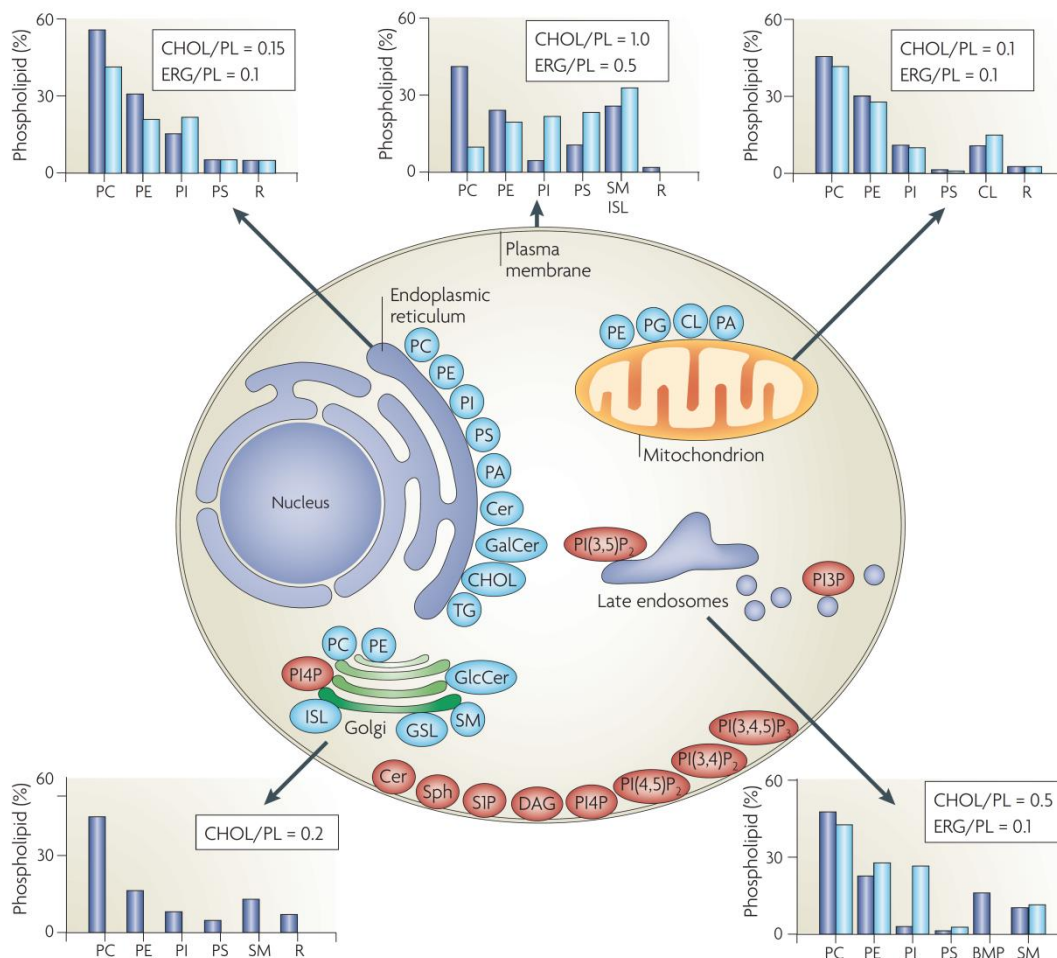
biosintesia MIMaren matrize aldeko gunean gertatzen denez, sintetizatu berri den CL MIMaren kontrako aldera pasatu behar da. MLCLAT1 entzimak CL metabolismoan parte hartzeko kate aziliko eta lisolipido espezifikotasunak ditu, monolisokardiolipinarekin fisikoki asoziatu daiteke eta CLrekin seguruenik ere bai. MLCLAT1-ren “knocking down” egin ostean, CLan inkorporatzen den linoleatoaren gutxipena ematen da (Taylor & Hatch, 2009). Beraz, entzima honek CLren birmoldaketan parte hartzeko gaitasuna du, baina prozesu honetan betetzen duen funtzio espezifikoa definitzeko ikerketak beharrezkoak dira (Claypool & Koehler, 2012). ALCAT1 MAM guneetan kokatuta dagoen eta lisolipidoak beraziltzeko gai den entzima da. Entzima honen bidezko CLren birmoldaketak, CL helduari egonkortasuna eta kate aziliko konposizio zehatza eman beharrean, mitokondrioaren disfuntzioaren seinaleak sortuko ditu CL “txarra” eratuz (Claypool & Koehler, 2012) (1.10 Irudia).

CLk orekan mantendu ahal izateko ordezkapen jarraia behar du, beste edozein konposatu biologikok bezala. CL gutxienez bi entzimen bidez degradatua izan daiteke; A fosfolipasa eta D fosfolipasa. Kaltzioarekiko independentea den A fosfolipasa CL deaziltzeko gai da, monolisokardiolipina edo dilisokardiolipina sortuz. Deazilazioekin jarraitzeko lisofosfolipasak beharrezkoak dira. Bidezidor hau apoptosian aktibatzen dela jakina da, CLren kontzentrazioa oso azkar jeisten denean. A fosfolipasaz gain D fosfolipasak ere CL degrada dezake. 2006. urtean, CLrentzat espezifikoa den D fosfolipasa berria deskribatu zen, fusio mitokondrialean parte hartzen duena (Choi *et al.*, 2006). Kasu honetan, CLren hidrolisiaren produktua fusogenikoa den azido fosfatidikoa da. Beraz, D fosfolipasa mitokondrialak dinamika mitokondriala eta CL metabolismoaren arteko lotura egin dezake.

Apoptosian zehar CLren degradazioa bere oxidazioarekin lotuta dago. Arnas kate mitokondriala oxigeno espezie errektiboen (ROS, ingelesetik *Reactive Oxygen Species*) iturburu nagusia da eta CL itu bikaina da ROS iturburutik oso hurbil dagoelako eta dituen kate aziliko insaturatuengatik. ROSen bidezko CL peroxidazio selektibo hau apoptosian zehar ematen den cyt c mitokondrialaren askapena baino aurretik ematen dela frogatu izan da (Kagan *et al.*, 2005; Ott *et al.*, 2007).

### **1.1.4.3 Erlazionatutako gaixotasunak**

Arestian aipatu den bezala, CL mitokondriako lipido espezifikoa da (1.11 Irudia). Hala ere, mitokondriako mintz bakoitzean dagoen CL kopurua zenbait eztabaidaren sorburu izan da. Jatorriz, CL MIM mintzean modu ia eskusibo batean zegoela pentsatzen zen, MOMean lipido guztien  $\approx$  5%a suposatuz batezbeste. Hala ere, MOM domeinu espezifikoetan, hau da CSetan, CLren kopurua  $\approx$  25% izan daitekeela ikusi zen ondoren (Ardail *et al.*, 1990; Simbeni *et al.*, 1991). Hain zuzen ere, CL kontaktu gune hauek eratzeko garrantzitsua izan daiteke lipido honek bigeruzak ez diren egiturak eratzeko duen gaitasuna dela eta (Schlame *et al.*, 2000).



**1.11 Irudia. Zelula osasuntsuetako organuluaren konposaketa lipidikoa.** Mintz desberdinen konposaketa lipidikoa zelulen barnean aldatzen da. Lipido konposaketaren datuak (grafikoetan adierazita daudenak) fosfolipido (PL) totalaren portzentai bezala adierazita agertzen dira. Ugaztunetan urdin iluna eta legamietan urdin argiaz adierazita daude. ERan dauden glizerofosfolipido nagusiak fosfatidilkolina (PC), fosfatidiletalonamina (PE), fosfatidilinositola (PI), fosfatidilserina (PS) eta azido fosfatidikoa (PA) dira. Gainera, ERak zeramida (Cer), galaktosilzeramida (GalCer), kolesterola eta ergosterola sintetizatzen ditu. Biek, ERak eta lipido tantatxoek, esteril ester eta triazilglizerol (TG) sintesian hartzen dute parte. Golgiaren lumena esfingomielina (SM), glikoesfingolipido konplexuen (GSLs) eta legamien inositol esfingolipidoen (ISL) sintesi lekua da. PtdCho ere Golgian sintetizatzen da eta proteinen jariaketarekin akoplatuta egon liteken diazilglizerol (DAG) aitzindariaren mailan. Mitokondriako fosfolipidoen %45 (batez ere PE, PA eta CL) organuluak berak era autonomo baten sintetizatzen ditu. Fosfatidilglizerola (PG), fosfatidilinositol-(3,5)-bifosfatoa (PI(3,5)P<sub>2</sub>), fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfatoa (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P), beste lipidoak (R), esfingosina-1-fosfatoa (S1P) eta esfingosina (Sph). (van Meer *et al.*, 2008)-tik hartutako irudia.

CLren ugaritasunean eta forma molekularrean ematen diren aldaketak zenbait egoera patologikoekin erlazionatuta daude, iskemia eta erreperfusioa, bihotz gutxiegitasuna, zahartzea,

heredatutako kardiomiopatia eta kardiomiopatia diabetikoa, eta minbizia besteak beste. Zahartze prozesuan ematen den gertaera goiztiarra funtzio mitokondrialaren gutxipena da. Zahartzearekin erlacionatutako erradikal askeen metaketak CLren murrizketa bat dakarrela proposatu da. Eta CL maila baxua entzima mitokondrialen aktibitateen murrizpenarekin erlacionatu izan da. Hala ere, CLren eraginez sortutakoa arrazoia edo bakarrik efektua den bereiztea zaila da (Schlame *et al.*, 2000). Zenbait garun tumoretan CLren kate azilikoan konposizioa aldatuta dago eta CL heldugabearen handipen bat ere badago, behaketa hauek minbizian ematen den energi metabolismoaren kalteak CLaren metabolismoan ematen diren aldaketekin erlazioa izan dezaketela iradokitzen dute (Kiebish *et al.*, 2008). CL defizientziak burdin homeostasi mitokondrial eta zelularren alterazioa dakar. Gainera, CLren kate azilikoan konposizioan dauden aldaketak eta CL kopuruaren murrizpena ere Barth sindromea pairatzen duten gaixoetan behatu dira.

Barth sindromea X-ari loturiko nahasmendu genetikoa da TAZ1 genean, tafazzina kodetzen duen genea, emandako mutazio batek sortzen du. Sindrome honek hurrengo ezaugarriak izaten ditu: miopatia kardiako eta eskeletikoa, mitokondria anormalak, neutropenia, arnasketa katearen kalteak eta azido 3-metilglutakoniko kontzentrazioaren gehipena gernuan. Gaixotasuna haurtzaroan hilgarria izaten da maiz, bihotz gutxiegitasun eta infekzio bakterianoak direla eta (Barth *et al.*, 1983; Barth *et al.*, 2004). Gaixoen fosfolipido analisisiek CL mailetan murrizpenak eta CL espezie molekular nagusiaren, hau da, tetralinoleoil (18:2) kardiolipinan murrizpen zorrotza erakusten dute. *Saccharomyces cerevisiae* legamien taz1 mutanteek Barth Sindromea duten gaixoez dituzten antzeko akatsak dituzte, modu honetan CLren birmoldaketa eta Barth Sindromea aztertzeko modelo ezin hobea direlarik (Brandner *et al.*, 2005; Claypool & Koehler, 2012a; Gu *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004).

#### **1.1.4.4 CLrekin interakzionatzen duten proteinak**

CLk proteina mitokondrial askorekin interakzionatzen du eta CLra batuta dauden proteina ezberdinen egitura kristalinoetan hiru hondar hirukote desberdinen (KKY, RKY, eta HRN) interakzioek eragindako lotura estuak detektatu dira; ondorioz, "XXY" motiboa, CLri batzeko sekuentzia gisa proposatu da, non X eta Y hondar positibo eta polarrak diren hurrenez hurren. Iradokitutako motibo hauen hondarrak berez ez dira aminoazido sekuentzian jarraian agertzen, beraz azpiunitate ezberdinetako hondarrek lagundu lezaketela ondorioztatu daiteke (Palsdottir & Hunte, 2004). Hala ere, gaur egun eskuragarri dauden CL:proteina egitura kopuru murriztua dela-eta, XXY motiboa CL batzeko motibo komuna dela onartzea arretaz hartu beharreko zerbait da. Lutter eta lankideen ikerketan, CLak tBIDen batura sustatu lezakeela proposatu zen, MOMaren bigerua lipidikoaren ezaugarri fisikoak aldatuz eta ez tBID:CL interakzio zuzen eta espezifiko baten bidez (Lutter *et al.*, 2000).

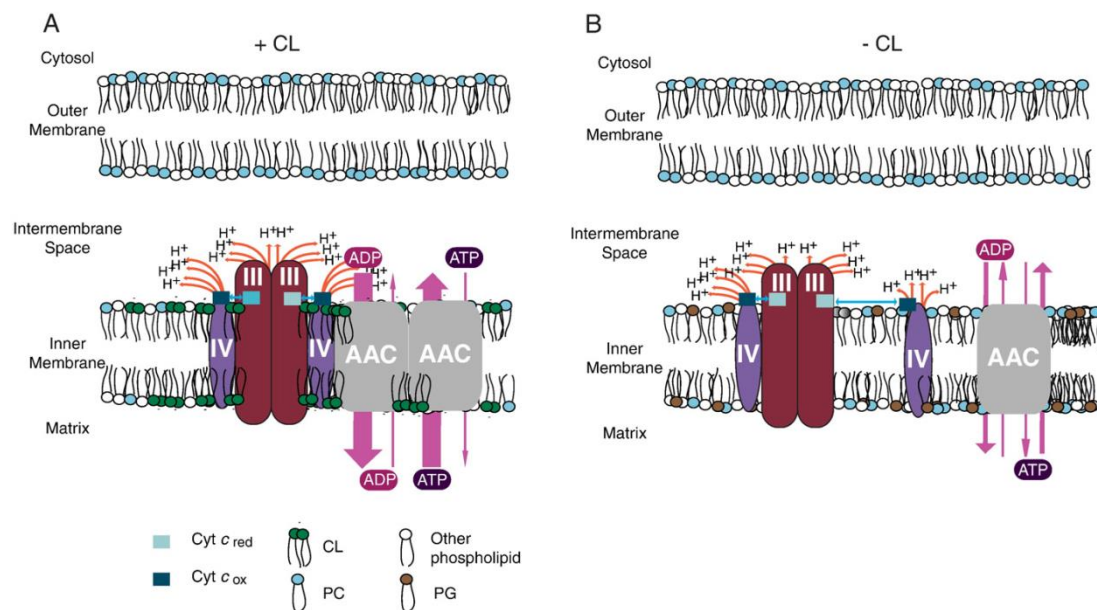
CLrekin interakzionatzen duten proteina gehienak MIMean kokatzen dira. Berretsitako interakzio guztien artean, ADP/ATP garraiatzailea (AAC, ingelesetik *ADT/ATP Carrier*) CL:proteina interkazioa aztertzekeo modelo ezin hobea da. AACak MIMean zeharreko  $ADP_{in}$  eta  $ATP_{out}$  trukea eragiten du. AAC dimero bakoitzeko 6 CL molekula tinko lotuta daudela behatu izan da. CLren buru polarra da CL eta AACaren arteko loturari afinitate handia ematen diona (Claypool, 2009). Legamiaren AACak aztertzean behatu zen mutazio puntual batek (C73S) proteinaren aktibitatea gutxitzen duela CLren absentsian. CLren absentsian C73S mutanteak duen garraio falta, AAC dimero bakoitzeko lotuta egoten diren 6 CL molekula horietatik CL molekula gehien galerarekin erlazionatu zen. Beraz, CL legamien AACaren aktibatzailea dela ondorioztatu zen. Gainera,  $\Delta taz1$  legamietan ematen den CLren absentsiak AACaren oligomerizazioan eragina du (Brandner *et al.*, 2005), CL AACaren aktibitate egokirako ezinbestekoa dela egiaztatuz. Legamien AACentzat CLK duen garrantziaz gain, zenbait datuk CL beste organismoetan AACaren funtziorako beharrezkoa dela iradokitzen dute. Lehenego behaketa da araztutako abere bihotzeko AACak ere dimero bakoitzeko 6 CL molekula dituela (Beyer & Klingenberg, 1985; Hoffmann *et al.*, 1994). Bigarrena, legamiaren AACak giza AACarekin antzekotasun egituralk dituela eta hori antzekotasun funtzionalekin lotuta egon litekela (Fontanesi *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2005). Hirugarrena, bihotz muskuluko mitokondrioetatik isolatutako behi AACaren egitura kristalinoak hiru CL ditu (Nury *et al.*, 2005). Laugarrena, arratoi garun mitokondrioetatik erauzitako AACaren berreraiketak CL edo PG beharrezkoak ditu (Imai *et al.*, 2003). Behaketa guzti hauek CLK AAC funtzioan indartsuki parte hartzen duela adierazten dute. Hala ere, CLK AAC egoera fisiologiko normaletan nola laguntzen duen ez dago oraindik argi. AAC arnas kateko superkonplexuekin interakzionatzen duela frogatu izan zen eta interakzio hau CLren absentsian murriztu edo guztiz desagertzen zela ere bai (Claypool *et al.*, 2008).

Arnas kateko konplexuak maila altuagoko egiturak sortuz elkartzen dira, arnasketa superkonplexuak edo respirasomak deitzen direnak. Superkonplexu funtzionalen forma desberdinak daude baina badirudi I konplexua beste konplexuen menpekoa dela. Superkonplexuen kopuru eta osagaiei dagokionez zelula mota desberdinetan behatu diren desberdintasunak direla eta, "plastizitate modelo" proposatu izan zen, zeinak zelula mota eta egoera fisiologiko desberdinek arnasketa superkonplexu desberdinen sorrera dakartzaten iradokitzen duen (Vartak *et al.*, 2013).

Superkonplexu hauek elektroiz garraioaren efizientzia handitzen dutela uste da, baina berriki egindako ikerketa batzuek euren garrantzi funtzionala zalantzan jartzen dute (Trouillard *et al.*, 2011). I, II eta III konplexuentzat elkarketa faktore asko aurkitu izan dira. Superkonplexuen eraketan aurkitu zen lehengo elkarketa faktorea CL da. CLren kontzentrazioaren murrizketa, mintz potentzialaren gutxipenarekin, ATP sintesiaren murrizketarekin eta funtzio mitokondrial orokorraren gutxipenarekin erlazionatuta zegoela ikusi zen (Gohil *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2000;

Santiago *et al.*, 1973). CL eta superkonplexuen arteko lotura agerian geratu zen Barth Sindromea duten gaixoetan superkonplexuak desegonkortuta daudela aurkitu zenean (McKenzie *et al.*, 2006). Ondoren CLK fisikoki I, III, IV eta V superkonplexuekin elkartzen dela zehaztu zen (Arnarez *et al.*, 2013a; Arnarez *et al.*, 2013b; Fry & Green, 1981). CL falta duten legamietan, superkonplexuen egonkortasuna eta garraio katearen kooperatibitatea erasanda dago (Bazán *et al.*, 2013; Claypool *et al.*, 2008; Fry & Green, 1981; Zhang *et al.*, 2005). Ondorioz, CLK superkonplexuen egonkortasuna mantentzen duela eta konplexu desberdinen arteko elektroio garraio efizientea mantentzen duela pentsatzea posiblea da.

CLK AACak arnasketa superkonplexuekin duen interakzioan ere hartzen du parte, izan ere, CLren absentsian AAC eta arnasketa superkonplexuen elkarketa murriztuta dago protoi garraio eta ATP ekoizpenaren akoplamenduaren murrizketa dakarrelarik. Ondorioz, AAC eta arnasketa superkonplexuetan ematen diren aldaketa egiturak ondorio funtzionalekin zuzenki erlazionatuta daude, zeintzuetan CLak berebiziko garrantzia duen (Claypool *et al.*, 2008; Claypool, 2009) (1.12 Irudia).



**1.12 Irudia. CLak fosforilazio oxidatiboaren efizientzia handitzen duen moduaren modeloa. A)** CLK cyt c-aren (karratu urdinak) garraioa errazten du III konplexuaren (obalo gorriak) eta IV konplexuaren (obalo moreak) III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>-AAC<sub>2</sub> superkonplexua egonkortuz eta AAC-aren (karratu grisak) aktibitatea areagotzen du. **B)** CLren absentsian, elektroio garraio katearen aktibitate absolutua gutxitzen da arnasketa superkonplexuen desegonkortze partziala dela eta, elektroio garraio katearen protoiak ponpatzeko gaitasuna deszentralizatuta dago, eta AAC<sub>2</sub> elektroio garraio katetik urrunago egotera pasatuko da. (Claypool, 2009)-tik hartutako irudia.

Mintzeko proteinekin edo proteina konplexuekin interakzioak izateaz gain, CLk cyt c bezalako proteina solugarriekin ere interakzioa dezake. Cyt c arnasketa kateko osagaietako bat da. Cyt c-aren %15 inguru dago CLri irmoki lotuta, gainerako proteina aske edo mintzarekin interakzio elektrostatikoa bidez ahulki lotuta aurkitzen da (Ott *et al.*, 2002; Sinibaldi *et al.*, 2013). Cyt c 104 amino azidoz osatutako kate bakarreko hemo proteina da, cyt c erreduktasa eta cyt c oxidasaren artean elektroiz garraiolari moduan funtzionatzen duena. Mitokondriotik askatzen denean, APAF-1 (ingelesetik, *Apoptosis Protease Activator Factor*) proteinari elkartuko zaio zitosolean eta konplexua eratuko dute, zeinak 9 pro-kaspasa aktibatuz, heriotz zelularrean amaituko den kaskada entzimatikoa ekarriko duen (Sinibaldi *et al.*, 2008). Gainera, CLri batuta dagoenean cyt c-ak CL peroxidazioa katalizatzen du, MOMP prozesuan lagunduz (Kagan *et al.*, 2005; Muenzner & Pletneva, 2014).

Cyt c:CL interakzioari buruzko lehenengo ikerketek cyt c-ak CLrekin bi gune desberdinen bitartez interakzionatzen duela erakutsi zuten, A gunea eta C gunea. A gunea positiboki kargatutako hondarrez osatuta dagoela uste da, non CL eta cyt c-aren arteko interakzioa elektrostatikoa izango den eta desprotonatutako CLk parte hartzen duen. Bestetik, C gunean ematen den CL:Cyt c interakzioa hidrofobikoa da eta cyt c N52 eta protonatutako CLren artean ematen den H-loturaz egonkortuta dago. CLren kate aziliko bat cyt c-aren gune hidrofobikoan barneratuta egongo da, beste guztiak fosfolipidoz osatutako bigeruzan barreiatuta egongo diren bitartean (Rytomaa & Kinnunen, 1995). Geroagoko ikerketa batek proteinaren interakzio gunea hemo-lotura gunean kokatutako eta positiboki kargatutako hondarrak dituen gunean kokatzen du. Albo kate horiek eratutako arrailak kate azilikoaren barneraketa baimentzen duela proposatu izan da, kate aziliko sakonki barneratuko delarik proteinaren hemo gunera iritsi arte (Kalanxhi & Wallace, 2007). Berriki, CLren bi kate aziliko, eta ez bakarrik bat konplexuaren eraketan proteinen barneratuko direla proposatu da. Modelo honen arabera, konplexuaren eraketan CLren talde fosfato eta proteinaren K79 eta K72 hondarren arteko interakzio elektrostatiokoek hartzen dute parte (Sinibaldi *et al.*, 2010, 2013).

Cyt c eta CLren arteko interakzioak proteinaren egitura tertziarioan aldaketak eragiten ditu, hemo batuketa gunean aldaketak ematen direlarik. Proteinak duen enpaketaketa-gutxieneko konformazioak, hidrogeno peroxidoa bezalako molekula txikien sarrera hemo gunera errazten du. Fosfolipidoa batuta duen cyt c-ak peroxidasa aktibitatea eskuratuko du, zeina apoptosiko garai goiztiarretan kritikoa den, CLrekiko espezifikoa den peroxidasa bezala funtzionatuz (Sinibaldi *et al.*, 2008). Peroxidatutako CL cyt c-aren MIMetik askapena eragiten duela ikusi da esperimenterik (Kagan *et al.*, 2005; Orrenius *et al.*, 2007; Ott *et al.*, 2007) MOMean eratu daitezkeen poro bidezko cyt c askapena ahalbideratuko duena. Beraz, CL eta cyt c-aren arteko interakzioak apoptosiaren seinalizazioan zehar askatuko den cyt c kopurua baldintzatzen du eta CLren modulazioa ere prozesu apoptotikoan zeharreko cyt c-aren askapenerako funtsezkoa da

(Ott *et al.*, 2002). Berriki, irudi fluoreszenteen analiziak cyt c-ak berak bakarrik poroak eratzeko duen gaitasuna erakutsi dute. Cyt c:CL interakzioak mintz kurbatura negatiboa eratzten du eta destolestutako cyt c konformeroek poroaren eraketa erraztu dezaketela proposatzen dute (Xu *et al.*, 2013).

MOMaren permeabilizazio mekanismoan BCL2 familiako kideek hartzen dute parte eta proteina pro- eta anti-apoptotikoen arteko ratioa izango da zelulak apoptosian sartzeko duen sentikortasuna zehaztuko duena. Proteina pro-apoptotikoetako bat BID da, 8 kaspasa proteinak moztu ostean tBID deituriko moztutako forma hartuko duena. Orain dela 10 urte baino gehiago, tBID BAX eta BAK proteinetan N-terminaleko aldaketa konformazionala eragiteko arduraduna dela aurkitu zen, bi proteina hauen (BAX eta BAK) oligomerizazio eta MOMean txertaketa ekarriko lukeena (Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Proteina birkonbinatuak eta CLrik gabeko mintz modelo sistemak erabiliz egin ziren saio azelularrek, tBID BAXen mintzeko txertaketa eragiten zuela, baina ez zuela BAXen oligomerizaziorik eragiten egiaztatu zuten (Roucou *et al.*, 2002). BAXen oligomerizazioa MOMP gertatzeko ezinbesteko pausua zela uste zenez (Antonsson *et al.*, 2000), elementu kritikoa saioan falta zela ondorioztatu zen, eta horrela, CL hautagai gako bezala aurkeztu zen (Kuwana *et al.*, 2002). Beraz, tBID mintzeko mikrodomeinuetan kokatzen dela proposatu zen eta bertan BAX CLan aberatsa den ingurune horretara bilduko lukeela (Lutter *et al.*, 2000, 2001). Testuinguru honetan, CLren funtzioa tBID mitokondriora bideratzea izango litzateke (Gonzalez *et al.*, 2008; Jalmar *et al.*, 2013; Ott *et al.*, 2002), nahiz eta bere funtzioa MTCH2/MIMP (ingelesez, *Mitochondrial Carrier Homologue 2/Met-induced Mitochondrial Protein*) proteinarekin gainjarri edo sinergizatu daitekeelarik, izan ere proteina hau tBIDen hartzaile bezala funtziona dezakeela proposatu izan baita (Zaltsman *et al.*, 2010).

CLren funtsezko ezaugarria mintzen kurbatura aldatzeko gaitasuna eta egitura ez-lamelarrak eratzeko duen gaitasuna da (Ortiz *et al.*, 1999). Mintzaren asaldatze hauek BAXen oligomerizazioa edota poro eraketa erraztu lezakete. Mintz antolakuntzaren asaldatzeak tBID bezalako BCL2 familiako proteinek ere eragin dezakete, izan ere tBID bigeruz lipidikoan asaldura egitura eragiten duela behatu baita (Epanand *et al.*, 2002; Terrones *et al.*, 2008). Kontrobertsia sortzen da tBIDen "CL batzeko gunea" identifikatzen saiatzean, bai H4, H5 eta H6 helizeetan (Lutter *et al.*, 2000), zein H6, H7 eta H8 helizeetan (García-Sáez *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2005) kokatua izan dena. Berriki, gunea H6 helizera murriztu izan da, non 157 eta 158 lisinak CLrekin modu elektrostatiakoan interakzionatzeko arduradunak direla ematen duen, modu horretan bigeruz lipidikoan asaldurak sortuz eta ondorioz BAX/BAK en oligomerizazioa eta MOMP erraztuz (Gonzalez *et al.*, 2010; Petit *et al.*, 2009).



CL apoptosiaren bidezidor intrintsekoan parte hartzeaz gain, II motatako apoptosi estrintsekorako ere ezinbestekoa da. Bidezidor estrintsekoak TNF superfamiliako kide diren (ad., TNF- $\alpha$ , Fas ligand [FasL]/Apo1L/CD95L, Trail/Apo2L, Apo3L) "heriotz ligando" extrazelularretan ematen diren seinaleak itzultzen ditu. Ligando hauek aurretik eraturako hartzaile konplexuetara batuko dira eta batuketa honek 8 kaspasaren aktibazioa dakar, FADD (ingelesetik, *Fas-associated Death Domain*) molekula adaptatzailearen bidez. 8 kaspasak, kaspasa efektoreak (3 kaspasa eta 7 kaspasa) edo BID aktibatuko du, tBID-en eraketa ekarriko lukeena eta CLrekin interakzionatuko lukeena bere urkila domeinuraren bidez (Gonzalez *et al.*, 2010). CLk 8 kaspasarentzat mitokondriako mintz gainazalean aingura eta ezinbesteko aktibazio plataforma sortzen duela behatu da (Gonzalez *et al.*, 2008). CLren absentiak eragindako asoziazio honen blokeoak 8 kaspasaren aktibazioaren inhibizioa dakar, BID-en mozketa inhibituz eta apoptosi ekidinez (Gonzalez *et al.*, 2013). CL:8 kaspasa interakzioaz gain, 8 kaspasaren translokazioa bideratzen duten proteinekin, BAR eta FLASH besteak beste, emandako interakzioek ere 8 kaspasaren eta CLren arteko erlazio funtzionalean paper laguntzaile bat izan dezakete (Jalmar *et al.*, 2013).

Bete behar dituen funtzio guztiak bete ahal izateko, mitokondrioak 1000 proteina inguru behar ditu, proteina guzti horien %99 nukleoan kodetzen dira eta erribosoma zitosolikoetan aitzindari bezala sintetizatzen dira, ondoren mitokondriora garraiatuko direlarik. Mintz mitokondrialak proteina aitzindari horien ezagumendu, translokazio eta mintz txertaketarako makinaria espezifikoak ditu (translokasak). Translokasa horietako batzuen eraketak CL behar dute. Kanpoko mintzeko translokasa (TOM; ingelesetik *Translocase of the outer Membrane*) eta sailkapen eta elkarketa makinariaren (SAM; ingelesetik *Sorting and Assembly Machinery*) kasuan adibidez. Gebert *eta lank.* erakutsi zuten TOM eta SAM konplexuen BN-SDS-PAGE patrioiak CLrik gabeko mitokondrioetan desberdinak zirela eta CLrik gabeko legami mutanteek proteina tolespen bidezidorretan atzerapenak zituztela (Gebert *et al.*, 2009). Behaketa hauek guztiak kontutan hartuz, CL translokazio konplexuen antolakuntzan funtzioaren bat izan lezakeela eta CLren galerak edo aldaketak mitokondrioko kanpo mintzeko zenbait proteinen tolespen prozesua kaltetu lezaketela iradokitu zuten.

Baina CL ez dago bakarrik kanpo mintzeko proteinen translokazio prozesuan inplikaturik, horretaz gain barne mintzeko proteinen translokazioan ere hartzen du parte. Zentzu honetan, CLk TIM23ren mintz txertaketa handitzen duela ikusi da, CLk preproteinen barneraketan eragina izan dezakeela iradokituz (Bajaj *et al.*, 2014; Kutik *et al.*, 2008; Van der Laan *et al.*, 2007).

Horretaz gain, CL dinamika mitokondrialetan ere parte hartzen du. Izan ere, CL Mgm1 eta OPA1en, MIM fusioa gertatzeko beharrezkoak diren proteinak legami eta ugaztunetan hurrenez hurren, monomerotik dimerorako prozesuaren erregulazioaren arduraduna dela behatu baita (Ban *et al.*, 2010; DeVay *et al.*, 2009; Rujiviphat *et al.*, 2009). Gainera, CL fisio mitokondrialetan

parte hartzen duen DRP1 proteinaren aktibazio funtzionalerako ezinbestekoa dela ematen du (Bustillo-Zabalbeitia *et al.*, 2014; Macdonald *et al.*, 2014; Ugarte-Urbe *et al.*, 2014).

### **1.1.5 FUSIO/FISIO MITOKONDRIALAREN MAKINARIA**

Sare mitokondrialak oso dinamikoak dira eta fusio eta fisio zikloen bitartez birmoldaketa jarraia pairatzen dute. Gainera, sare mitokondrialak birmoldaketa endekatua pairatu dezake estres zelularra, energia eskaera aldaketa eta kaltzio maila intrazelularrean emandako gorabeheren ondorioz (Autret & Martin, 2009; Kasahara & Scorrano, 2014; Mishra & Chan, 2014). Mitokondriaren morfologia kontrolatzeaz gain, fusio eta fisio prozesuak mitokondria populazioaren propietate funtzionalak mantentzeko ere beharrezkoak dira. Gainera, dinamika mitokondrialak garapen prozesu eta apoptosian ere inplikaturik dago (Kasahara & Scorrano, 2014; Mishra & Chan, 2014).

Fisio eta fusio mitokondrialean parte hartzen duten proteina nagusiak dinaminen superfamiliako kideak dira, mintz egitura berrantolatzeko gaitasun intrintsekoa duen proteina taldea da, oligomerizazio eta GTP hidrolisiaren menpekoko delarik beraien funtzioa. Dinamika mitokondrialean parte hartzen duen identifikatutako lehenengo genean Fzo (ingelesetik, *Fuzzy Onion Gene*) izan zen, *Drosophila melanogaster* espermatogenesisian parte hartzen duten geneen proba batetik isolatu zena (Hales & Fuller, 1997). Fzo GTPasen mitofusina familiaren sortzailea da. Aurkikuntza honek dinamika mitokondrialaren oinarri molekularren ezagumenduan aurrerapausu azkarrak lortzea baimendu zuen.

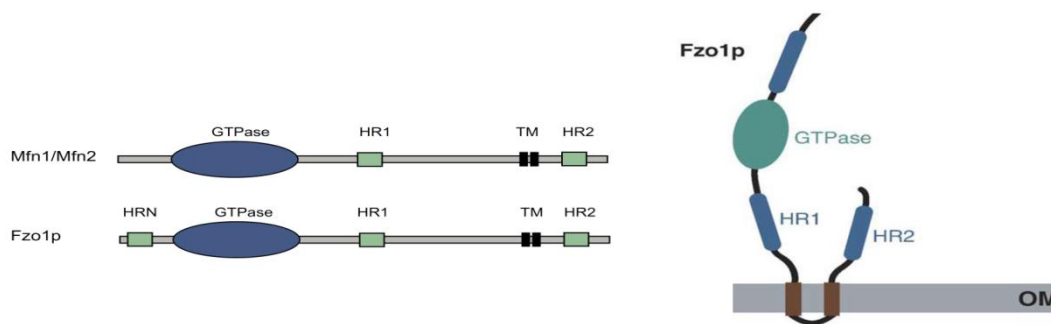
#### 1.1.5.1 Fusio makinaria

Fusio mitokondrialaren makinariaren muina legamietatik gizakietara kontserbatutako bi proteinaz osatuta dago: MOMeko GTPasa den Fzo/Mitofusina eta MIMeko Mgm1/OPA1.

Mitofusinak kontserbatutako GTPasak dira mitokondriako kanpo mintzean kokatzen direnak. Fzo1 proteina legamietan aurkitzen dugu eta bi homologoak, mitofusina 1 (MFN1) eta mitofusina 2 (MFN2) ugaztunetan. Giza MFN1 eta MFN2 %63-ko antzekotasuna dute eta domeinu funtzional berdinak dituzte, C-terminalean kokatutako transmintz domeinua bi bider MOMa zeharkatuko duena eta coiled-coil domeinua, baita heptada errepikapen domeinu (HR2) bezala ezagutzen dena, eta N-terminalean kokatutako GTP-batzeko domeinua eta beste coiled-coil domeinua (HR1) (1.13 Irudia).

GTPasa domeinuak 5 GTPasa motibo ditu, G1, G2, G3, G4 eta G5. G1 motiboak GTP molekularren fosfatoa lotzen du, G3 motiboak hidrolisirako beharrezkoa den  $Mg^{2+}$  koordinatzen du, G1, G2 eta G3 motiboek zentro katalitiko osatzen dute eta G4 eta G5 motiboek GTP batzeko konformazio espezifikoak ematen dute (Bourne *et al.*, 1990, 1991; Zorzano *et al.*, 2010). Heptada

errepikapen hidrofobikoak sekuentzia motiboak dira zeintzuetan zazpi hondarretako tandem errepikapenetako lehen eta laugarren posiziotan hondar apolarrek kokatuta dauden eta coiled-coil helize egiturak osatzen dituzten. Legamien Fzo1 proteinak hirugarren heptada errepikapen gunea du N-terminalean (HRN) (Zhang & Chan, 2007). HR2 domeinua ondoz ondoko bi mitokondrioen arteko elkarketan parte hartzen du, coiled-coil egitura dimeriko antiparalelo baten bidez lortzen delarik, zeina homotipikoa (MFN1-MFN1) edo heterotipikoa (MFN1-MFN2) izan daitekeen (Chen *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 2004).



**1.13 Irudia. Mitofusina eta Fzo1 proteinen domeinuak eta egitura.** (Griffin *et al.*, 2006 and Zhang & Chan, 2007)-etik moldatutako irudia.

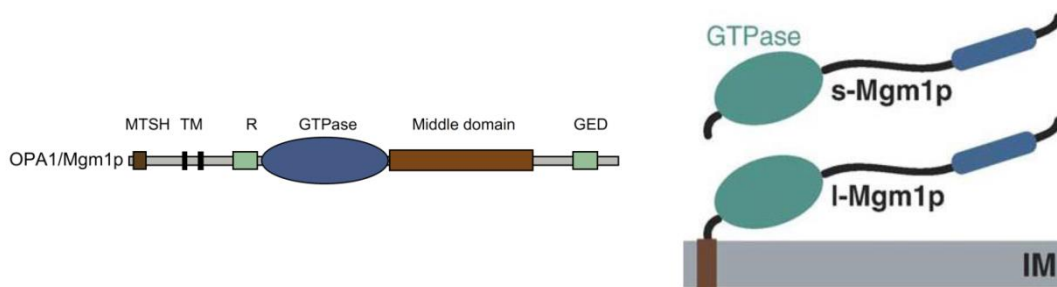
Proteina hauek fusio mitokondrialean duten parte hartzea euren geneen “knocking down”-ak egiten aurkitu zen.  $\Delta$ Fzo1 legamietan mitokondriak fragmentatuta daude eta mtDNA galtzen da (Westermann, 2003). Ugaztunetan, MFN1 edo MFN2ren galerak heriotz enbrioniko goiztiarra dakarrenez, mitofusinak garapen enbrioniko goiztiarrerako garrantzitsuak direla proposatu da (Chen *et al.*, 2003). Bestalde, MFN2ren gainadierazpenak mitokondrioen multzokatze perinuklearra eragiten du, lotura intermitokondrialaren bitartekaria izateko gaitasuna duela iradokitzen duena (Rojo *et al.*, 2002). Mitokondriaz osatutako multzo hauek mitokondria fragmentatu txikien agregatuak direla behatu zen (Huang *et al.*, 2007). Horretaz gain, MFN2 genean ematen diren mutazioak Charcot-Marie-Tooth (CMT) izeneko nahasmedu neurologikoaren sorreraren arduradunak dira (Cartoni *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2006; Kijima *et al.*, 2005; Verhoeven *et al.*, 2006; Züchner *et al.*, 2004). Dinamika mitokondrialean duten funtzioaz gain, mitofusinek ER itxura eta mitokondrio:ER lotura erregulatzen dute. MFN2 kentzen denean ERak besikula luzeak eratzen dituela behatu zen, MFN2 proteinak ER tubulazioan paper bat izan lezakeela iradokituz. CMT gaixotasuna eragin dezaketen MFN2 mutazioek ER:mitokondrio arteko loturan ondorioak izan dezakete eta ER:mitokondrio lotura  $Ca^{+2}$  seinalizazioarekin lotuta dagoenez, zelula hauetan  $Ca^{+2}$  seinalizazioa asko murrizten da (de Brito & Scorrano, 2008).

Arestian aipatutako arrazoiengatik mitofusina mailak kontuz erregulatuta egon behar dute. Fzo1 proteinaren degradazioa erregulatzeko bi modu behintzat badaude. Lehen mekanismoan

MDM30 proteinak hartzen du parte, zeina SCF E3 ubiquitin ligasa konplexuaren osagaia den. Konplexu honek zenbait proteina ubiquitinatzen ditu eta ondoren 26S proteasomak degradatuko ditu (Escobar-henriques *et al.*, 2006). Mekanismo honek orekan dagoen hazkuntza zehar funtzionatuko du. Bigarren mekanismoa parekatze-garaian ematen da eta ez du MDM30 proteinaren beharrik, baina ubiquitina eta proteasomaren menpeko prozesua da eta  $\alpha$ -parekatze feronomaren ostean ematen da (Neutzner & Youle, 2005).

Ugaztunen mitofusinen kasuan, BAX eta BAK molekulek MFN2 funtzioa erregula lezaketela iradokitzen duten zenbait emaitza badaude. BAXen adierazpenak MFN2ren lokalizazioa MOMera mugatzen du, MFN2ren mintz mugikortasuna murrizten du eta MFN2ren konplexu eraketa areagotzen du. Ondorioz, kasu honetan BAX eta BAK proteinek funtzio ez-apoptotikoa izan lezakete MFN2 bitartez fusio mitokondrialak eraginez (Youle & Karbowski, 2005). BAX eta BAK proteinaz gain, mitofusinekin elkartzen diren zenbait proteina identifikatu dira, MIB (Ingelesetik, *Mitofusin-binding Protein*) (Eura *et al.*, 2006), Stoml2 (ingelesetik, *Stomatin-like Protein 2*) (Hájek *et al.*, 2007) eta MARCH-V (ingelesetik, *Membrane Associated RING-CH-V*) besteak beste (Nakamura *et al.*, 2006).

Fusio mitokondrialaren makinariako bigarren osagaia OPA1 proteina da (Mgm1 legamietan). OPA1 aurkitua izan zen bere genearen mutazioek atrofia optiko autosomiko dominantea (ADOA, ingelesetik *Autosomal Dominant Optic Atrophy*) gaixotasuna eragiten dutelako (Alexander *et al.*, 2000). OPA1 dinamarekin erlazionatutako GTPasa bat da zeina mintz arteko gunean kokatu daitekeen egoera solugarrian edo MIMera lotuta ager daitekeen. Proteinak mitokondriara bideratzeko sekuentzia (MTS, ingelesetik *Mitochondrial Targeting Sequence*) du N-terminalean, lokalizazio mitokondrialak baimentzen diona. Gune honek ere prozesamendu mitokondrialak duen peptidasarako (MPP, ingelesetik *Mitochondrial Processing Peptidase*) hiru usteko mozketak gune ditu. MTSaren ostean, usteko transmintz domeinua du jarraian dauden bi segmentu hidrofobikoz osatuta dagoena, gero coiled-coil domeinua, GTPasa domeinua, middle domeinua eta GED domeinua izan daitekeen C-terminaleko coiled-coil domeinua ditu (1.14 Irudia)(Zhang & Chan, 2007).

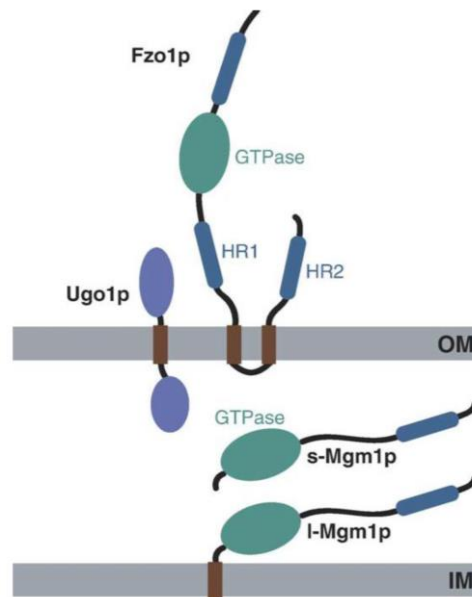


**1.14 Irudia. OPA1/Mgm1 proteinen domeinuak eta egitura.** (Griffin *et al.*, 2006 and Zhang & Chan, 2007)-tik moldatutako irudia.

Bai OPA1, bai Mgm1 proteinak itzulpen osteko prozesamendua jasaten dute. Mgm1 orekan bi isoforma desberdinetan agertu daiteke, isoforma luzean (l-Mgm1) edo laburrean (s-Mgm1). l-Mgm1 aitzindaria MIMera doanean eta bertan MTS gunean MPPak mozten duenean ekoizten da. MTS mozketa ematen den unean, aitzindaria TIM konplexuarekin asoziatuta egon daitekeela uste da. TIM konplexutik lateralki kanporatua bada l-Mgm1 sortuko da, MIMarekin bere lehen segmentu hidrofobiko bidez lotuta egongo delarik. TIM konplexutik irtetzeko prozesua atzeratzen bada, aitzindaria matrizerara bideratuko da bigarren segmentu hidrofobikoa MIMera lotuko delarik. Puntu honetan, proteasa ronboide mitokondrialak (Rbd1/Pcp1), Mgm1 bigarren mozketa gunean moztuko du eta s-Mgm1 sortuko da (Herlan *et al.*, 2004; Mcquibban *et al.*, 2003). Prozesu hau Ups1 proteinak erregulatzen du, barne mintzarekin asoziatutako proteina mitokondrial dena (Sesaki *et al.*, 2006).

Ugaztunetan OPA1 zenbait isoforma desberdinetan aurkitu daiteke, transkripzio-osteko eta itzulpen-osteko erregulazioz sortuak. Gizakietan, 8 mRNA isoforma desberdin aurkitu ditzakegu moztitsasketa alternatiboz sortuak. OPA1 proteinak aitzindari bezala ekoizten dira N-terminalean MTS dutelarik. Inportazio mitokondrialean zehar, MPP bidezko mozketa aitzindariaren 87-88 hondarretan gertatzen da matrizean L-isoforma eratzeko. Ondoren, bigarren prozesamendua ematen da 194-195 hondarretan S1 isoforma sortuz. 7. bariantearen kasuan, prozesamendu proteolitikoak jarraitzen du eta 217-223 hondar inguruan ematen da, horrela S2 isoforma sortuko delarik (Ishihara *et al.*, 2006). Mozketa hau hiru proteasa desberdinek egin dezakete: PARL (ingelesez, *Preselinin-associated rhomboid-like protease*), i-AAA protease den Yme1L eta m-AAA proteasa den paraplegina (Song *et al.*, 2007; Zorzano *et al.*, 2010). Proteasa guzti horietaz gain, OMA1, MIMean kokatutako M48 familiako zink metaoproteasak OPA1en inaktibazio proteolitikoan funtsezkoa eta ez errendundantea den papera joka dezakeela aurkitu izan da (Quirós *et al.*, 2012).

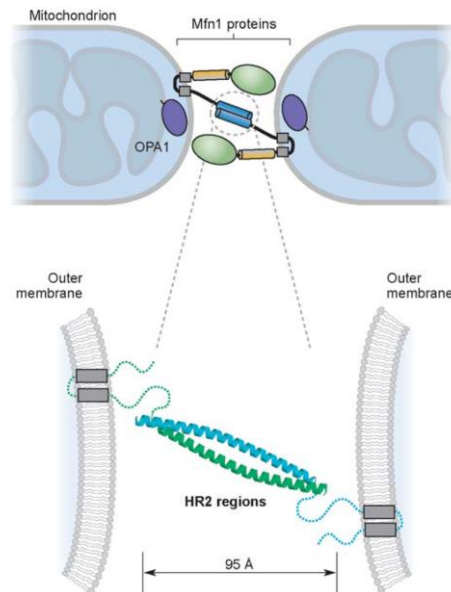
MIMarekin duen asoziazioa dela eta MIM fusioa aurrera eramateko hautagai ona izan litekeela proposatu zen. Hain zuzen ere, legamietan ematen den fusio mitokondrialerako Mgm1 guztiz beharrezkoa dela argi ezarrita dago (Sesaki *et al.*, 2003). Fusio mitokondrialean betetzen duen paperaz gain, OPA1/Mgm1 faltan zuten zelulek oso gangar desantolatuak zituztela behatu zen, gangar birmoldaketan izan lezaketan parte hartzea iradokituz (Griparic *et al.*, 2004). Gainera, OPA1 proteinan zelulak apoptositik babestu ditzakeela proposatu da, gangar arteko loturen diametroa mugatuz eta ondorioz cyt c askapena saihestuz (Frezza *et al.*, 2006).



**1.15 Irudia. Legamietako fusio mitokondrial konplexua.** (Griffin *et al.*, 2006)-tik hartutako irudia.

Arestian aipatu den bezala, OPA1 mutazioek ADOA eragiten dute, erretinako ganglio zelulen galeraren ondorioz sortutako nerbio optikoaren endekapena (Alexander *et al.*, 2000). ADOA gaixotasunaren aleloek OPA1 proteinaren ezaugarri biokimikoak kaltetuta dituztela deskribatu zen, batez ere lipidoekin elkartzeko duten gaitasuna. OPA1-s isoforma bigeruz lipidikoarekin interakzionatu dezake, elkarrekintza honek GTPasa aktibitatea areagotzen duelarik. CL, MIMeko negatiboki kargatutako lipidorik ugariena izanik, OPA1 aktibitatea erregula dezakeen lipidoa izan litekeela proposatu da (Ban *et al.*, 2010). Gainera, OPA1 proteinaren homologoa den legamietako s-Mgm1 proteinak ere lipidoekin interakzionatu behar du bere aktibitatea egokia izan dadin (Rujiviphat *et al.*, 2009). ADOA gaixotasuna eragiten duten beste zenbait mutazio patogenikoek, OPA1 proteinaren adierazpenaren murrizpena eragiten dute, fosforilazio oxidatiboaren urritasun nabariarekin erlazionatuta dagoena, batez ere I konplexuarekin erlazionatutakoa. OPA1 eta AIF fisikoki interakzionatzen dutela behatu zenez, AIF eta OPA1 proteinek konplexu bat era lezaketeela proposatu zen, I konplexuaren egonkortasunean eta erregulazioan funtzioaren bat izan lezakeena (Zanna *et al.*, 2008).

Ugo1 legamien fusio makinariako hirugarren osagaia da, orain arte proteina honen homologorik ez delako ugaztunetan aurkitu. Ugo1 MOMean kokatzen den proteina da, N-terminala zitosolean eta C-terminala mintz arteko gunean kokatuta dituelarik (Sesaki & Jensen, 2001). Ugo1, Fzo1 eta Mgm1 proteinak fusio konplexu bat eratuz elkartzen direla deskribatu zen. Ugo1en N-terminalak Fzo1 lotzen du eta Ugo1en C-terminalak Mgm1 lotzen du. Ugo1 kanpo eta barne mintzen arteko aldamio bezala joka lezake bi mintzen arteko fusio prozesuak koordinatuz (1.15 Irudia) (Sesaki & Jensen, 2004).

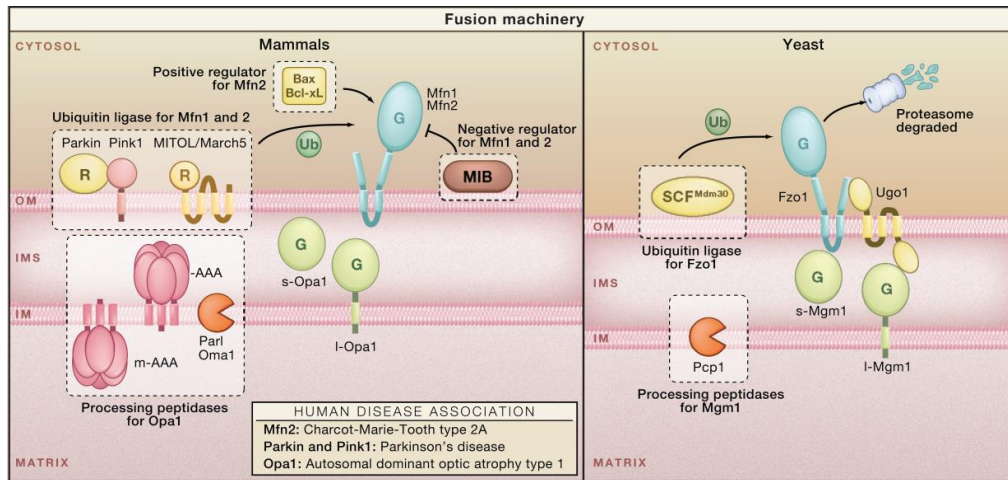


**1.16 Irudia. Mitokondrioen arteko lotura modeloa.** (Chan, 2006b)-tik hartutako irudia.

Fusio mitokondrialak matrizeko edukien nahasketa dakar, kanpo eta barne mintzak era koordinatu batean fusionatu behar direla iradokitzen duena. Bi prozesu hauek irmoki koordinatuta daude, nahiz eta indibidualak eta mekanistikoki desberdinak diren. Kanpo mintzeko fusioa gertatzeko euren artean hurbiltzen dauden bi mitokondriak lotu behar dira konexio pausu batean. Lotura hau MFN1/MFN2 proteinek gauzatuko dute ugaztunetan edo Fzo1 proteinak legamietan. Mitofusinek konplexuak *trans* moduan eratzea posiblea da, hau da, ondoz-ondoko bi mitokondrioen artean, beraz beharrezkoa da proteina hauek fusionatuko diren bi mintzetan aurkitzea. Ikerketa biokimikoek adierazten dute MFN1en HR2 domeinua beste MFN1en HR2 domeinuarekin oligomerizatzeko gai dela, baina baita MFN2ren HR2 domeinuarekin ere. Horrela, konplexu homotipiko zein heterotipikoak era daitezke (Chan, 2006b) (1.16 Irudia).

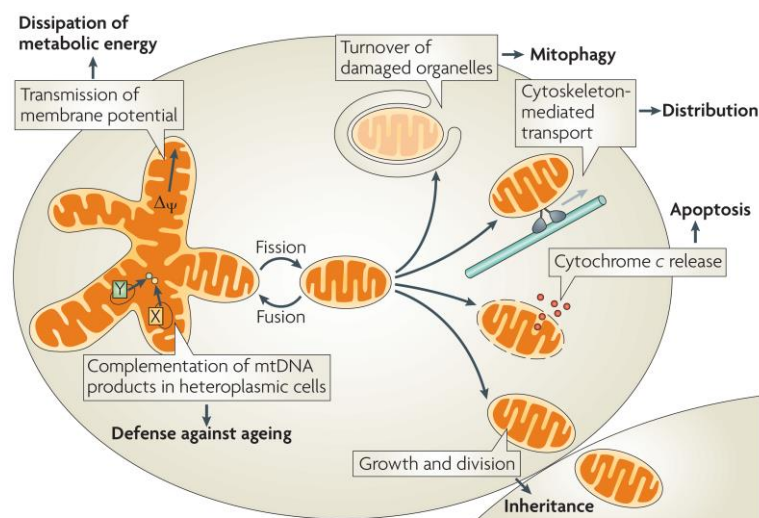
Egitura honek aposizio hertsia baimenduko du, baina oraindik hutsune nabaria egongo da. Fusioa gertatzeko aldaketa konformazional bat beharrezkoa da, zeina mintz mitokondrialen arteko hurbilketa areagotuko duen. Aldaketa konformazional hau GTPasa domeinuan gertatuko da eta nukleotidoen menpekoea izango da. Kanpo mintzeko fusioa amaitzean, OPA1 fusioa emango deneko bi barne mintzetan egon beharko da. Mgm1en isoforma luzeak bi mintzak lotuko dituela eta isoforma laburraren GTPasa menpeko konformazioa bideratuko dituela proposatu da, horrela barne mintzaren bigeruz lipidikoaren nahasketa ematen hasiko da (Griparic *et al.*, 2007; Westermann, 2010). Kanpo eta barne mintzako fusio makinarien arteko koordinazioa emateko Ugo1 proteina dago legamietan. Ugo1 proteinak bi proteinek (Fzo eta Mgm1) interakzionatzen du fisikoki, bi prozesu desberdin hauen arteko koordinazioan parte

hartu lezakeela iradokitzen duena. Hala ere, Ugo1ekiko egituralki edo funtzionalki baliokideak diren proteinak ez dira ugaztunetan aurkitu (Sesaki & Jensen, 2004) (1.17 Irudia).



**1.17 Irudia. Ugaztunetako eta legamietako fusio makinariako osagai nagusien eskema.** (Tamura *et al.*, 2011)-tik hartutako irudia.

Fusio mitokondrialaren prozesua organuluaren funtzio normalerako guztiz ezinbestekoa da eta funtzio askotan hartzen du parte. Adibidez, fusio mitokondrialak mtDNAren herentzia eta mantenurako garrantzitsua da. Fusioak nukleo konplementu osoa eta mitokondrioren kodetutako produktu genetikoak dituen mitokondria populazioa mantentzeko funtsezko mekanismoa dela uste da. Mitokondrioren fusioa eta mitokondriako gene produktuen konplementazioa zahartze prozesuaren aurkako defentsa mekanismoak dira. Horretaz gain, ATP ekoizpen handia behar duten estres egoeretan fusioa areagotzen dela behatu da, fusioa energia eskaera handiko egoeretan energiaren mantenurako garrantzitsua ere badela iradokitzen (Westermann, 2010) (1.18 Irudia).

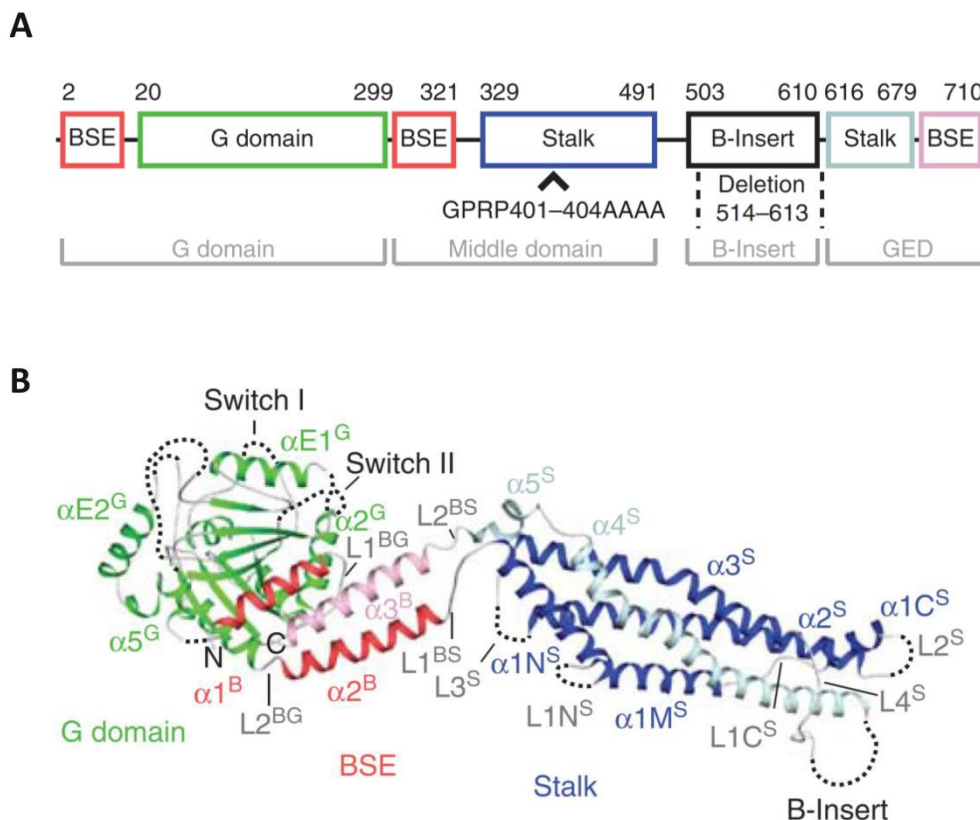


**1.18 Irudia. Dinamika mitokondrialen funtzio biologikoak.** (Westermann, 2010)-tik moldatutako irudia.



### 1.1.5.2 Fisio makinaria

Fisio mitokondrialaren erregulatuak nagusia GTPasen dinamika familiako kide den proteina zitosolikoa da, DRP1 ugaztunetan eta DNM1 legamietan. DRP1 80KDa dituen proteina da, batez ere dimero edo tetramero moduan agertzen dena soluzioan eta mintzekin batu ostean oligomero handiagoak eratzen dituena. DRP1 proteinak dinamikekin hiru domeinu elkarbanatzen ditu; N-terminalean kokatutako GTPasa domeinua, DRP1 multimerizazioan parte hartzen duen Middle domeinua, eta oligomerizazioarekiko menpekota den GTPasa aktibateterako ezinbestekoa den C-terminalean kokatutako GTPasa domeinu efektorea (GED, ingelesetik *GTPase Effector Domain*) (Elgass *et al.*, 2013; Smirnova *et al.*, 2001) (1.19 Irudia). Horretaz gain, DRP1 proteinak B intsertoa deituriko domeinua ere badu middle domeinu eta GED domeinuen artean kokatuta dagoena, B intserto hau DRP1 funtzioaren erregulazioan parte hartu lezake (Strack & Cribbs, 2012).

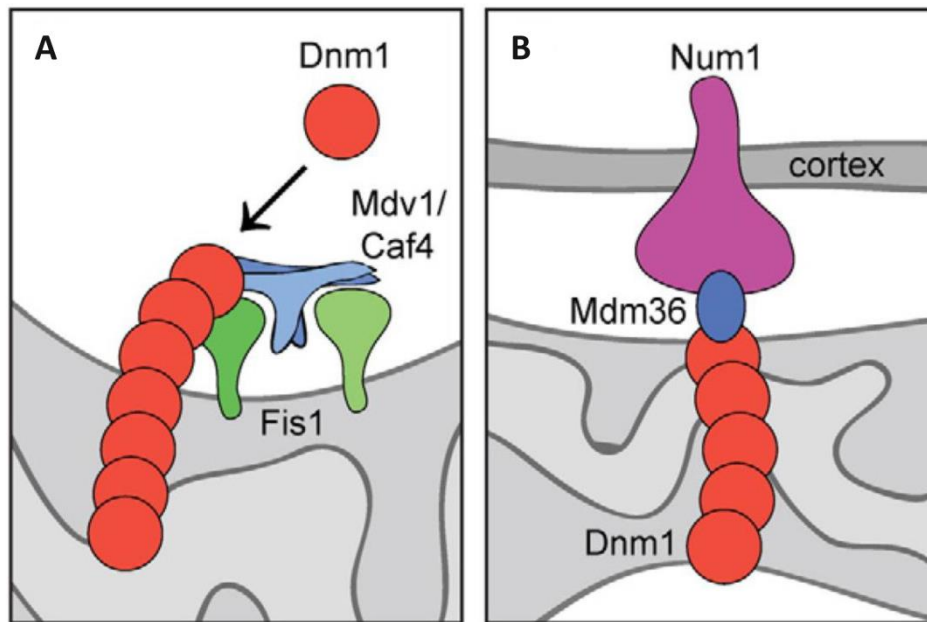


**1.19 Irudia. Giza DRP1 proteinaren egitura. A)** Egituran oinarritutako DRP1 proteinaren domeinuak. DRP1ek lau domeinu aurkezten ditu: GTPasa domeinua (G), G domeinutik stalk domeinurako aldaketa konformazionalen transmisioan parte hartzen duen BSE domeinua (ingelesetik *Bundle Signalling Element*), DRP1 funtzioaren erregulazioan parte hartzen duen B intsertoa eta DRP1en multimerizazioan parte hartzen duen stalk domeinua. **B)** DRP1 proteinaren egitura (4BEJ), X-izpien difrakzio bidez lortutako egitura da 3.48 Å –etako erresoluzioa duena. (Fröhlich *et al.*, 2013)-tik hartutako irudia.

Bi proteinak, bai DNM1 bai DRP1 zitosolean kokatzen dira eta mitokondriora translokatzeko dira euren funtzioa bete ahal izateko. Behin mitokondriara translokatzeko direnean, seguruenik CLAN aberatsak diren gune diskretuetan kokatzen dira, etorkizunean fisio guneak izango diren lekuetan (Bustillo-Zabalbeitia *et al.*, 2014; Macdonald *et al.*, 2014; Ugarte-Urbe *et al.*, 2014). DRP1/DNM1 proteinak mitokondriora bideratzeko zenbait hartzaile edo proteina adaptatzailek ere parte hartu lezaketela proposatu izan da.

FIS1, MOMean eta baita peroxisometan zehar modu uniformearen barreiatutako proteina, DNM1 proteina baten adaptatzaile bezala joka lezake legamietan (Autret & Martin, 2009; Mozdy *et al.*, 2000). FIS1 DNM1ekin zuzenki batzen da bi adaptatzaileetako baten bidez, MDV1 edo CAF4. Berriki argitaratutako analisi egiturek erakusten dute MDV1 proteinak antiparaleloak diren coiled-coil egiturak sortuz dimerizatzen dela, modu horretan bi FIS1 molekulen azalera ahurren artean kokatuz (Egass *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Beraz, DNM1 proteinak MDV1 proteinarekin B intsertoan kokatutako lau hondar hidrofobikoen bidez interakzionatuko du (Bui *et al.*, 2012). Normalean gune hau proteina barnealdean kokatuta dago, interakzioa baimentzen duen konformazio aldaketa bat beharrezkoa dela iradokitzen duena. MDV1 proteinak lehentasunezko batuketa ematen duenez GTP batuta duen DNM1en formarekin, aldaketa konformazional hori GTPak suspertu lezakeela proposatu da (Cervený & Jensen, 2003; DeVay *et al.*, 2009; Naylor *et al.*, 2006). Fisio mitokondrialak gero DNM1en oligomerizazioarekin egiten du aurrera, modu horretan organuluaren inguruan espiralak sortuko dituelarik. DNM1 nukleotido egoera desberdinetan diametro maila desberdin askotako oligomeroak eratzeko gai da, horrek DNM1 oligomeroek mitokondrioen *in vivo* konstrikzioa ahalbideratuko lukeen plastizitatea dutela iradokitzen du (Mears *et al.*, 2011). Azkenik, DNM1 espiralek GTP hidrolisia eman ostean mintz mitokondrialak fisionatuko dituzte (Westermann, 2010).

Berriki, fisio mitokondrialean bitartekotza egiten duten eta FIS1 proteinarekin elkarreragiten duten bi proteina aurkitu dira legamietan, NUM1 eta MDM36. NUM1 eta MDM36 proteinek DNM1ekin mitokondrioa zelula-azalarekin aktinaren bidez lotzeko interakzionatzen dutela iradokitu da, modu horretan banaketa mitokondrialak erraztuko litzateke mintz tensioaren ondorioz (Cervený *et al.*, 2007; Hammermeister *et al.*, 2010). Beraz, legamietan bi DNM1-fisio konplexu daude, lehena DNM1/MDV1/FIS1 proteinez osatutakoa eta bigarrena DNM1/NUM1/MDM36 proteinek osatzen dutena (1.20 Irudia). Proteina konplexu hauen eraketa erregulatzen duten mekanismoak ez dira oraindik ezagutzen.



**1.20 Irudia. Fisio mitokondriala legamietan.** **A)** DNM1 biltze plataforma FIS1 proteinaz eta MDV1(CAF4) proteina adaptatzailearen dimeroez osatutakoa **B)** Bigarren fisio konplexua non DNM1 zelula azalera lotuta dagoen NUM1 eta MDM36 proteina laguntzaileen bitartez. (Elgass *et al.*, 2013)-tik moldatutako irudia.

Ugaztunetan, gero eta datu gehiagok iradokitzen duen DRP1 eta FIS1 proteinek fisio bidezidor desberdinetan jarduten dutela. Zentzu honetan, ugaztunetako FIS1 proteina TBC1D15ren bilketa prozesuan parte hartzen duela ikusi da, zeina aldaketa morfologikoekin erlazionatutako prozesuan parte hartzen duen, baina badirudi aldaketa morfologiko horiek DRP1 menpekoak ez direla (Onoue *et al.*, 2013). Horretaz gain, DRP1 mitokondriara bideratzeko gai den MFF (ingelesezik *Mitochondrial Fission Factor*) proteina ere aurkitu da, zeina ez duen FIS1en presentziaren beharrik. MFF MOMera lotuta dago eta coiled-coil domeinu zentrala du proteinaren lokalizazio egokirako beharrezkoa dena, C-terminala zitosolera esposatuta du eta N-terminal errepikapen labur bi DRP1 batzeko gune izan daitezkeela proposatu dena (Otera *et al.*, 2010).

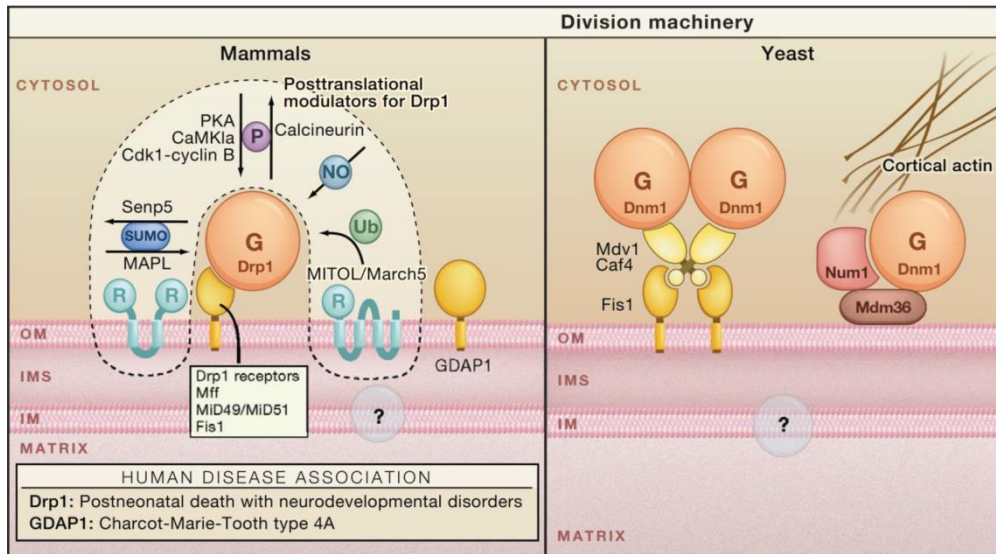
MFF proteinaz gain, beste bi proteina ere DRP1 mitokondriara bideratzeko gai direla behatu da ugaztunetan, bi proteina hauek MiD49 eta MiD51 dira (ingelesezik, *Mitochondrial Dynamics proteins of 49 and 51KDa*, hurrenez hurren). Proteina hauek mitokondriara lotuta agertzen dira gune diskretuetan N-terminalaren bitartez, organuluaren inguruan eraztunak eratzuz (Palmer *et al.*, 2011). MiD51 proteinak FIS1 proteinarekin interakzionatzeko gai dela erakutsi da MID51/FIS1/DRP1 proteina konplexua eratzuz, konplexu honek fisio mitokondriala blokeatu eta fisio mitokondriala eragiten du mitofusinekiko modu ez-menpekoan (Zhao *et al.*, 2011).

Ugatzunen fisio mitokondrialean parte hartzen duten beste proteina batzuk MTP18 (Tondera *et al.*, 2005), MIMean kokatzen dena eta GDAP1, MOMean kokatutako dena dira (Niemann *et al.*, 2005). MTP18ren gainadierazpenak fragmentazio mitokondriala eragiten duela behatu zen, efektu hau fusio mitokondriala areagotuz konpensatzen zelarik. Horretaz gain, MTP18ren iRNA bidezko “knockdown” eginez, fisio mitokondriala blokeatzen da, MTP18 fisio prozesua osatzeko beharrezkoa dela iradokituz (Tondera *et al.*, 2005). Bestalde, GDAP1 MOMera atxikitutako proteina da eta mitokondria sarearen fragmentazioa eragiten du. CMTarekin erlazionatutako GDAP1en mutazioetan proteinaren gaitasun hau galtzen da. Oinarri honetan, autoreek GDAP1 proteina sare mitokondrialaren erregulatu bezala definitzen dute (Niemann *et al.*, 2005).

DRP1 inaktiboa batez ere zitosolean kokatzen da, nahiz eta proteinaren kopuru txiki bat fisio gune izango diren mitokondriako gune zehatzetan kokatzen den (Smirnova *et al.*, 2001), seguruenik erretikulu endoplasmaticoaren tubuluek mitokondria kontaktatzen duten guneetan (Friedman *et al.*, 2011; Korobova *et al.*, 2013). MOMean, DRP1 MFF eta MiD49/51 bezalako proteina adaptatzaileekin interakzionatzen du eta funtzionalitate osoa lortzen du CLrekin espezifiki interakzionatu ostean (Bustillo-Zabalbeitia *et al.*, 2014; Macdonald *et al.*, 2014; Ugarte-Urbe *et al.*, 2014). Fisio mitokondriala gertatzeko, DRP1ek organuluaren inguruan oligomerizatu behar du. Mitokondriaren diametroa 0,5-1  $\mu\text{m}$  tartekoa dela jakinda, zaila da azaltzea 127 nm-ko diametroa duen eraztun batek mitokondria nola bildu dezakeen azaltzea (Fröhlich *et al.*, 2013). Hala ere, arestian aipatu den bezala, fisio mitokondriala ER:mitokondria kontaktu guneetan ematen da batez ere eta gune hauetan IFN2 proteina (ingelesetik, *Inverted Formin 2*), aktinaren polimerizazio eta depolimerizazioa azkartzen duen ornodun forminproteina, aktibatzen da eta aktina polimerizatzen du. Aktina polimerizazio honek, hasierako konstrikzio mitokondriala gertatzeko beharrezkoa den indarra eman lezake (Korobova *et al.*, 2013), ondoren DRP1en oligomerizazioaz jarraitua izango dena eta GTP hidrolisiaren menpeko fisio mitokondriala emango litzateke (Lackner & Nunnari, 2009) (1.21 Irudia).

Fisio mitokondriala funtzio mitokondrial normalerako ezinbestekoa da. Hain zuzen ere, morfologia mitokondrialaren erregulazio txarra zenbait giza gaixotasunekin erlazionatuta dago. DRP1en dominante negatibo forma batek anormaltasun fisiologiko asko dakartza, atrofia optikoa eta hipoplasia besteak beste. Horretaz gain, DRP1en funtzioa aldatzen duten aldaketek Alzheimer, Parkinson eta Huntington gaixotasunekin erlazionatu izan dira.

Prozesu honen garrantzia kontutan izanik, irmoki erregulatuta izan behar du arestian aipatutako egoera patologikoak ekiditeko. DRP1en aktibitatea itzulpen-osteko zenbait aldaketengatik erregulatzen da. Aldaketa kobalente posible guztietatik, DRP1 fosforilatua, sumoilatua ubikitinatua, S-nitrosilatua eta O-GlcNazilatua izan daiteke.



**1.21 Irudia. Ugaztun eta legamietako fisio makinariako osagai nagusien eskema.** Kanpo mintzeko proteina integral asko DRP1 (DNM1) mitokondriara bideratzen dute. **A)** Ugaztunetan, MFF eta MID49/51 zuzenean interakzionatzen dute DRP1ekin, modu horretan DRP1 mitokondria gainazalean lotzen dutelarik. Kanpo mintzeko beste proteina integral batek, GDAP1, DRP1-menpeko fisio mitokondrialean parte hartzen duela behatu da ugaztunetan; hala ere, bere funtzio zehatza zein den ez da ezagutzen. Zenbait itzulpen osteko aldaketek erregulatzen dute DRP1en funtzioa ugaztunetan: MITOL/March5-menpeko ubikitinazioa, SUMOilazioa, fosforilazioa eta N-nitrosilazioa. **B)** Legamietan, DNM1 MOMera bi konplexuen bitartez bideratzen da. FIS1 proteinak DNM1 biltzen du WD40 domeinua duten bi proteina adaptatzaileen bitartez, MDV1 eta CAF4. Mekanismo honetaz gain, MDM36 eta NUM1 proteinak ere mitokondriaren gainazalera bideratu dezakete DRP1. (Tamura *et al.*, 2011)-tik hartutako irudia.

Proteinen fosforilazioa kinasek bideratutako itzulpen-osteko aldaketa da, substrato espezifikotasun handia du eta seinalizazio zelular bidezidorretan aldaketa funtzionalak modu azkarrean txertatzeko abantaila aurkeztzen du (Chang & Blackstone, 2010). DRP1 kontserbatutako bi leku desberdinetan fosforilatu izan daitezke, serina 616 eta 637an. Cdk (ingelesetik, *Cyclin Dependent Kinase*) S616an fosforilatzen du eta mitosian zeharreko fisio mitokondriala eragiten du (Taguchi *et al.*, 2007). PKA (ingelesetik, *cAMP-dependent protein kinase*) DRP1 S637an fosforilatu dezake, bere GTPasa aktibitatea murriztuz eta fisio mitokondriala gutxituz (Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007).  $Ca^{2+}$ -menpeko kalzineurinak hondar hau defosforilatu dezake fisio mitokondriala eraginez (Cribbs & Strack, 2007). DRP1en kalzineurinarekin menpeko defosforilazioak DRP1ek mitokondriarekin duen lotura kontrolatzen du (Cereghetti *et al.*, 2008). Azkenik, kalmodulinarekiko menpekoa den I $\alpha$ can kinasak, hondar bera (S637) fosforilatu dezake kaltzio fluxu baten ostean eta horrela DRP1ek mitokondriarekiko duen afinitatea areagotzen du, ondorioz fisio mitokondriala areagotuz (Han *et al.*, 2008). Hondar berdinarekin bi kinasak desberdinen bitarteko fosforilazioak guztiz kontrajarrirako ondorioak ekar ditzake, honek azpimarratzen du DRP1en zein gunetan eta

DRP1en aktibitatearen zein puntutan fosforilatu beharrak duen garrantzia (Chang & Blackstone, 2010).

DRP1, ubiquitin-bezalako aldatzaile txikiaz (Sumo, ingelesezik *small ubiquitin-like modifier*) ere eraldatu daiteke. Sumo gehitzerakoan normalean proteinen lokalizazio subzelularra aldatzen da edo ubiquitinaren-bitarteko degradazioaz babesten ditu proteinak. DRP1 E2 Ubc9 sumo-konjugatzaile entzimak sumoilatu dezake (Figuroa-Romero *et al.*, 2009). DRP1, MAPL, E3 Sumo ligasa entzimarentzako substrato ere bada, zeina DRP1 desumoilatzeko gai den (Braschi *et al.*, 2009). Berriki deskribatu da SENP3, sumo espezifikoa den isopeptidasaren eskuragarritasunak DRP1en 2/3-Sumoilazioa erregulatzen duela iskemian zehar, fisio mitokondriala inhibituz (Guo *et al.*, 2013). BCL2 familiako kideek ere DRP1en aktibitatea erregula dezakete, bere sumoilazioa erregulatuz. Zentzu honetan, BAX/BAK proteinek DRP1 eta mitokondriaren mintzaren arteko lotura egonkorra eragiten dutela proposatu da, DRP1en sumoilazioa sustatuz (McBride *et al.*, 2006).

Sumoilatua izateaz gain, DRP1 erlazionatutako prozesu batez ere eraldatua izan daiteke, ubiquitinazioz. Mintzarekin asoziatutako RING-CH (MARCH)-V proteinak DRP1 batu eta ubiquitinatzeko gaitasuna du. MARCH-V DRP1entzako ubiquitina ligasa bezala funtzionatzen du eta bakarrik ubiquitinatutako DRP1ekin eratzen ditu konplexuak. Ubikitinazio honek fisio mitokondrialean efektu inhibitzailea izan lezake (Nakamura *et al.*, 2006). Parkin proteinak DRP1 ubiquitinatu lezakeela ere deskribatu da, DRP1 eta mintzaren arteko lotura sustatuz eta ondorioz fisioa areagotuz (Poole *et al.*, 2008).

S-nitrosilazioa oxido nitriko (NO) bidezko erredox-erlazionatutako eraldaketa da, zeinak NO aktibitatea garraiatu eta zenbait proteina afektatzen dituen.  $\beta$ -amiloide proteinen ondorioz eratutako NOak fisio mitokondriala eragiten du (Cho *et al.*, 2009).

DRP1entzat deskribatutako azken itzulpen osteko eraldaketa O-GlcNazilazioa da (ingelesezik, *O-linked N-acetyl-glucosamine glycosylation*). Eraldaketa hau proteina nuklear, zitosoliko eta mitokondrialen serina eta treonina hondarretan eman daiteke. Normalean, O-GlcNazilazio eta fosforilazio guneak gainjartzen dira, proteinen funtzioan elkarrenganako ondorioak izanik. DRP1en O-GlcNazilazio guneak B intsertuan kokatuta daude, zehatzago Thr-585 eta Thr-586 hondarretan. O-GlcNazilazioak GTP batzeko afinitatea areagotzen du eta baita mitokondriarekiko lotura ere (Gawlowski *et al.*, 2012).

Fisioa funtzio biologiko askorentzat ezinbestekoa den prozesua da (1.18 Irudia). Adibidez, fisioa banaketa mitokondriarentzat oso garrantzitsua da, sare mitokondriala osatzen duten mitokondrioak garraituak izan daitezkeen unitate txikiagotan bananduz. Zelulak mitosian sartu baino lehen eta zitokinesia pairatu baino lehen mitokondriak fragmentatuak agertzen dira.

Honek zelula alaben mitokondrioen banaketa estokastikoa baimentzen du. Horretaz gain, fisioa mitokondriaren prozesu autofagikoan ere parte hartzen du, mitofagia izeneko prozesuan hain zuzen ere. Prozesu honen bidez, mitokondria disfuntzionalak zelulatik kentzen dira, kaltetutako mtDNAren proliferazioa ekidinez.

Fisio mitokondrialak apoptosirako garrantzitsua ere bada (Westermann, 2010). Apoptosiaren erregulazioan DRP1en menpeko fragmentazio mitokondrialak hartzen du parte organismo desberdin askotan, legamiak, zizareak, euliak eta ugaztunak besteak beste. Horretaz gain, BAX eta BAK proteina proapoptotikoek DRP1 eta mitofusinekin interakzionatzen dutela ikustean, honek dinamika mitokondrialaren eta apoptosiaren makinarien arteko elkarrekintza bat dagoela iradokitzen du (Brooks *et al.*, 2007; Karbowski *et al.*, 2002; Karbowski *et al.*, 2006; Wasiak *et al.*, 2007). DRP1 proteinak BAXen oligomerizazioa sustatzen duela behatu da eta ondorioz apoptosian ere badu eginkizunik (Montessuit *et al.*, 2010). Nahiz eta fisioaren funtzioa apoptosian zein den eztabaidan jarraitzen duen gai bat den, badirudi ardi dagoela mitokondriaren fragmentazioa bidezidor apoptotikoaren estadio goiztiarrean ematen dela, mitokondriaren kanpo mintzaren iragazkortzea baino apur bat lehenago edo aldi berean eta kaspasa efektoreen aktibazioa baino lehen (Westermann, 2010).

## 1.1.6 BCL2 FAMILIAKO PROTEINAK

*Bcl-2* proto-onkogenea t(14:18) deitutako kromosomaren translokazioaren parte bezala identifikatua zen. Gene horren transkripzioaren goranzko erregulazioa dela eta BCL-2 proteinen sintesi mailak gora egiten du, limfoma folikularren zelulen fenotipo gaiztoan lagunduko duen faktore nagusietako batean bihurtuz (Bakhshi *et al.*, 1985). Ordutik aurrera, BCL2 familia osatzen duten 20 kide baino gehiago identifikatu dira. Bestalde, familiako proteinek gutxienez lau BCL2 homologia domeinuetatik (BH1, BH2, BH3, and BH4) bat daukate. (Youle and Strasser 2008, Chipuk *et al.* 2010). BH domeinuz gain, BCL2 familiako kide askok gune hidrofobikoak dituzte C-terminalean, mintz intrazelularretara bideratu eta lotzeko balio dutenak.

Betetzen duten funtzio eta BH domeinu kopuruaren arabera, BCL2 familiako kideak hiru taldeetan sailka daitezke (1.22 Irudia):

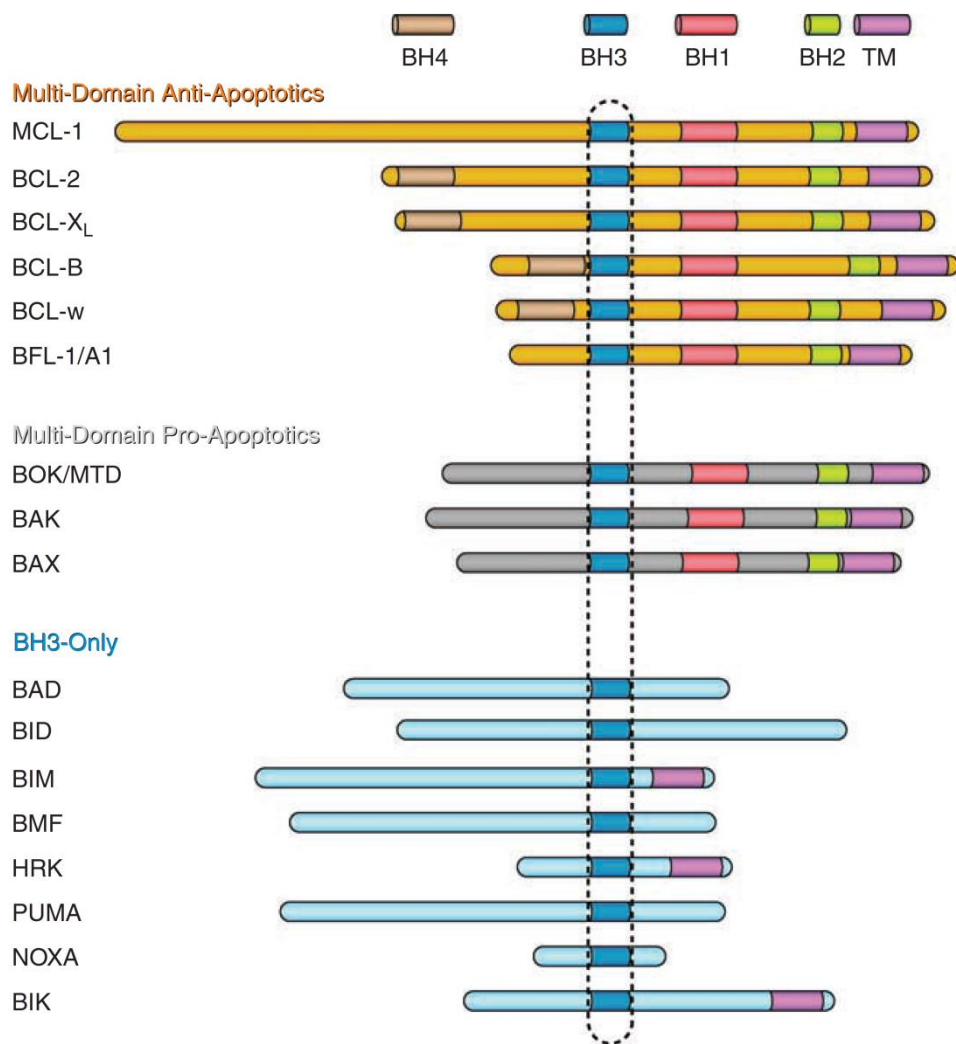
- **Domeinu anitzeko proteina antiapoptotiko edo BCL-2-moduko proteinak:** lau BH domeinuak aurkezten dituzte eta MOMP inhibitzeko gaitasuna daukate. Talde honen adibide esanguratsuenak BCL-2, BCL-xL (ingelesetik *B-cell lymphoma-eXtra Large*), MCL-1 (ingelesetik *Myeloid Cell Leukemia-1*) eta A1 edo BCL-2A1 (ingelesetik *BCL-2-related protein A1*) proteinak dira.

- **Domeinu anitzeko proteina proapoptotikoak edo BAX-moduko proteinak:** proteina mota hauek MOMP-eragile zuzenak izango dira eta BH1-3 domeinuak dituzte. Talde honetan BAX (ingelesez *BCL-2 Associated X protein*), BAK (ingelesez *BCL-2 Associated Killer protein*) eta BOK (ingelesez *BCL-2-related Ovarian Killer*)/MTD (Matador) proteinak daude. Nahiz eta sekuentzia kontutan harturik BOK proteina proapoptotikotzat hartzen den, ez dago argi BAX/BAK proteinek egiten duten modu berdinean funtzionatzen duen. Zenbait argitalpenek BOK proteina proapoptotiko moduan joka dezakeela esaten duten bitartean (Brown *et al.*, 2004; Echeverry *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2006; Soleymanlou *et al.*, 2005), beste batzuek funtzio proapoptotikorik ez duela iradokitzen dute (Ke *et al.*, 2012; Ray *et al.*, 2010).
- **BH3-domeinu bakarreko proteinak:** Hauek BH3 domeinu bakarra aurkezten dute eta BAX-moduko proteinak aktiba ditzakete MOMP eraginez. Talde honetan BID, BIM (ingelesez *BCL-2-Interacting Mediator of cell death*), PUMA (ingelesez *p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*), BMF (ingelesez *BCL-2-Modifying Factor*), BAD (ingelesez *BCL-2 antagonist of cell death*), BIK (ingelesez *BCL-2-interacting killer*) PMAIP1 (ingelesez *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein*) arrunki NOXA bezala ezaguna dena, eta HRK (ingelesez *Activator of apoptosis hara-kiri*) aurkitu ditzakegu.

Biziraupen edo heriotza zelularren patua proteina anti- eta proapoptotikoen mailen eta beraien arteko elkarrekintzen baitan egongo da (Westphal *et al.*, 2011). Garrantzizkoa da aipatzea oraintsu deskribatutako sailkapenak zelula eta ingurugiro berezietan BCL-2 eta BAX-moduko proteinek pairatu ditzaketen funtzio aldaketak ez dituela kontuan hartzen (Basañez *et al.*, 2001; Clem *et al.*, 1998; Fannjiang *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1999; Qi & Hardwick, 2008). Honez gain, proteina hauek egitura eta sekuentzia antzekotasunak erakusten dituzten arren, talde berdineko kide ezberdinek funtzio fisiologiko desberdinak bete ditzakete.

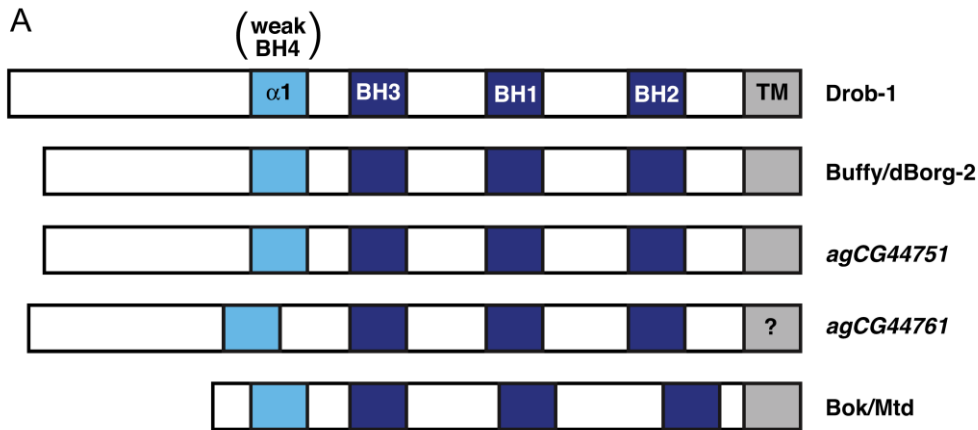
Heriotz zelularren bidezidorreko osagaiak oso kontserbatuak izan dira eboluzioan zehar *C. elegans*, *Drosophila*, eta ugaztunetan esaterako. Ugaztun zeluletan, BCL2 familiako kide pro eta antiapoptotikoak heriotz zelularrerako mugatzaile molekularrak dira. *C. elegans* nematodoan egin diren ikerketa genetiko eta biokimikoek erakusti dute BCL2 familiako kide diren eta funtzio kontrajarriak dituzten bi proteina, EGL-1 eta CED-9, direla zizarearen heriotz zelularra erregulatzen dutenak. Aitzitik, *Drosophila*-k bi BCL2 familiako gene ditu, zeintzuk ugaztunetako proteina proapoptotikoa den BOK/MTD proteinen homologoak diren proteinak kodetzen dituzten (Igaki & Miura, 2004). Bi proteina hauek Debcl/dBorg-1/dRob-1 eta Buffy/dBorg-2 dira. Honek iradokitzen du BCL2 familiako kiderik antzinakoena BOK dela (1.23 Irudia).





**1.22 Irudia. BCL2 familiako proteinen sailkapena.** Kontserbatutako BCL2 homologia domeinuak (BH1-4) kolore desberdinekin adierazita agertzen dira. BH domeinuez gain, kide gehienek domeinu hidrofobikoa daukate C-terminalean (TM) mintz intrazelularrekin ematen den lotura errazten duena. (N. N. Danial, 2009)-tik hartutako irudia.

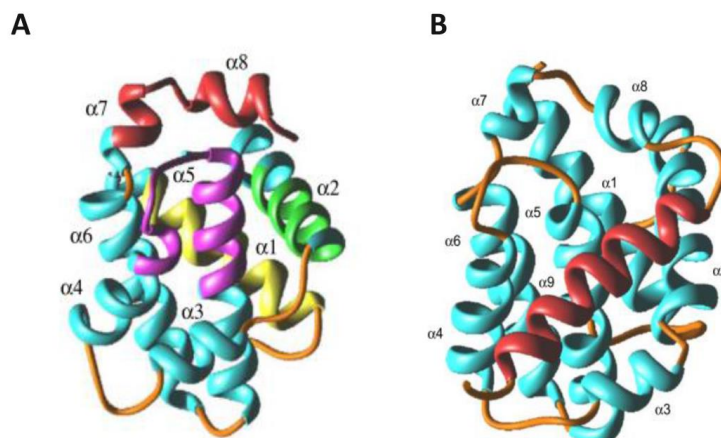
Sekuentzia eta egitura antzekotasunetan oinarrituz, Debcl eta Buffy funtzio proapoptotikoa izan dezaketela uste izan da. Hain zuzen ere, Debcl heriotza eragiten duen proteina dela ikusi da bai *in vitro* eta bai *in vivo* ere. Debcl-ren gainadierazpenak heriotza eragiten du bai *Drosophila* bai ugaztun zeluletan ere, eta baita zenbait *Drosophila* larba ehunetan (Colussi *et al.*, 2000; Igaki & Miura, 2004). Debcl proteinarekin bezala, Buffy proteinaren gainadierazpenak S2 zeluletan heriotza eragiten du, nahiz eta hiltzeko duen gaitasuna Debcl proteinak duena baino txikiagoa den (Igaki & Miura, 2004). Aitzitik, beste ikerketa batek proposatzen du Buffy proteina antiapoptotikoa dela *in vivo* (Quinn *et al.*, 2003).



**1.23 Irudia. Eboluzioan zehar kontserbatutako BCL2 proteinen eskema.** *Drosophila*-n (Drob-1 eta Buffy/dBorg-2), *Anopheles*-en (agCG44751 eta agCG44761) eta ugaztunetan (Bok/Mtd). BH1, BH2, BH3, lehen  $\alpha$ -helizea ( $\alpha 1$ ), eta transmintz (TM) domeinuak adierazten dira.  $\alpha 1$  BH4 domeinuarekin egituralki erlazionatuta dago, eta gune hau “weak BH4” edo “BH4 ahul” bezala adierazita agertzen da. TM domeinua agCG44761-ren iragarritako sekuentzian ez da ageri. (Igaki & Miura, 2004)-tik hartutako irudia.

#### 1.1.6.1 BCL2 familiako proteinen egitura soluzioan

Mintz proteinak aztertzeko ohiko teknika egiturak erabiltzearen zailtasuna dela eta, orain arteko BCL2 familiako kideen inguruko informazio egituraren datu gehienak proteina hauek soluzioan duten egiturari dagozkio. Hala ere, molekula hauek mintzari elkartuta aurkezten duten egoeren informazio egitura azalerraten hasi da, apoptosian zehar gertatzen diren mintzerako translokazioa eta mintz txertaketak eragiten dituzten aldaketa egiturei buruzko funtsezko informazioa eskeiniz.



**1.24 Irudia. BCL2 familiako proteinen egitura. A) BCL-XL eta B) BAX proteinen egitura.** (Petros *et al.*, 2004)-tik hartutako irudia.

Azken bi hamarkadetan, X-izpi kristalografia eta Erresonantzia Magnetiko Nuklearra (NMR, ingelesetik *Nuclear Magnetic Resonance*) erabili izan dira BCL2 familiako proteinen konformazio hidrosolubleen maila atomikoko erresoluzioa duen informazio egiturala lortzeko. BCL2 familiako kideen egitura azterketek apoptosiaren mekanismo molekularren eta proteina hauen arteko elkarrekintzen inguruko xehetasun ugari eskaini dituzte. BCL2 familiako kide gehienek, nahiz eta aminoazido sekuentzian eta funtzioan dibergentzia handiak izan, nabarmenki antzeko tolesturak aurkezten dituzte (Petros *et al.*, 2001). Oro har, tamaina txikiko proteina globularrak dira, erdialdeko bi helize hidrofobiko inguratzen dituzten luzera ezberdinetako sei edo zazpi helize anfiptatikoz osatuak daude. Erdialdean kokatzen diren bi helizeak ( $\alpha 5$ - $\alpha 6$ ), "erdiko helize urkila" ere deituak, proteinaren muina osatzen dute; albo batetik  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  helizeengatik eta kontrako aldetik,  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  helizeengatik inguratuta daude; azkenik, behealdean  $\alpha 7$ - $\alpha 8$  helizeak kokatzen dira. BCL-2 tolestura komun honek bakterio toxinen (e.b. kolizina eta difteria toxina) domeinu poro-eragilearekin antzekotasun deigarriak aurkezten ditu (Muchmore *et al.*, 1996; Petros *et al.*, 2004). BCL2 proteinen egiturak duen beste ezaugarri amankomun bat BH1, BH2 eta BH3 domeinuen eratzeko duten gune hidrofobikoa da, hauekin elkarrengaino duten beste BCL2 proteinen BH3 domeinua sartzeko gunea izango dena (Liu *et al.*, 2003; Sattler *et al.*, 1997). Hala ere, helizitate altua duen kimikoki-eraldatutako BIM BH3 peptido sintetikoak (SAHB BIM BH3) BAX beste gune baten lotzen duela ikusi da, ez kanonikoa den poltsiko hidrofobikoan BAX  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  helizeek eratutakoa (Gavathiotis *et al.*, 2008). Gainera, talde berdinak berriki deskribatu du BID BH3 eta PUMA BH3 SAHB peptidoak BAXen gune kanoniko zein gune ez-kanonikoak batzen dituztela (Edwards *et al.*, 2013; Leshchiner *et al.*, 2013). Bestalde, BCL2 familiako kide gehienek, C-muturrean mitokondrion bideratzeko domeinu transmintz baten ezaugarri klasikoak dituen sekuentzia zatiki ( $\alpha 9$ ) hidrofobiko bat agertzen dute. Aitzitik, BH3 domeinu-bakarreko proteinak, BID eta agian BIK salbu, baldintza fisiologikoetan desegituratuta aurkituko dira batik batik (Hinds *et al.*, 2007) (1.24 Irudia).

BAXen NMR bidez deskribatutako egiturak erakusten du  $\alpha 9$  helizea poltsiko hidrofobikoaren barruan kokatzen dela (Suzuki *et al.*, 2000). Konformazio honek BAXen solugarritasunera laguntzen du BAX zitosolean dagoenean eta baldintza ez-apoptotikoetan BAX MOMarekin era egonkor batean lotzea ekiditzen du. Gainera, poltsiko hidrofobikoa betez, 9-helizeak BAX eta BH3-domeinu bakarreko proteinen arteko interakzioa ekiditen du (Suzuki *et al.*, 2000). Aipatzekoa da, C-terminaleko gune hidrofobikoa faltan duen BAKen egituran, zenbait hondar apolarren albo kateek estutzen duten poltsiko hidrofobikoa agertzen dela. Hau BH3-domeinu bakarreko proteinekin interakzioa mugatzeko mekanismo alternatiboa da (Moldoveanu *et al.*, 2006). Nahiz eta aurrerapausuak eman diren (Czabotar *et al.*, 2013; Moldoveanu *et al.*, 2013), BH3-domeinu bakarreko proteina proapoptotikoen eta BAX/BAK proteinen arteko loturen espezifitateak azaltzen dituzten oinarri egiturak ez dira guztiz ezagutzen. Garrantzitsua da aipatzea, BOK proteinaren inguruko informazio egiturarik ez dela aurkeztu orain arte.

### 1.1.6.2 BCL2 familiako proteinek bideratutako MOMParen erregulazioaren ikuspuntu orokorra

BCL2 proteinen apoptosian zeharreko akzio mekanismoaren zenbait aspektu ondo ezarrita daude. Batetik, zelula osasuntsuetan BAX eta BAK egoera “inaktibo” batean daude eta proteinen aktibazioak MOMP eragiten du eta horren ondorioz faktore apoptogenikoen askapena (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). Bestetik, baita ere argi dago BCL2-motatako proteinek eta BH3-domeinu bakarreko proteinek BAX-motatako proteinen aktibazio funtzionala negatiboki eta positiboki erregulatzen dutela, hurrenez hurren (Llambi & Green, 2011; Zong *et al.*, 2001).

Hala ere, BCL2 familiako proteinen mekanismoaren inguruko erantzunik gabeko galdera asko daude, besteak beste: (i) Zelan doaz BCL2 familiako proteinak MOMera?; (ii) Zein da BAX/BAK/BOK proteinen aktibazio funtzionalerako bidezidor molekular zehatza?; (iii) Zelan aktibatzen dituzte BH3-domeinu bakarreko proteinek BAX-motatako proteinak?; (iv) Zelan erregulatzen dute MOMP prozesua mintzera lotatutako BCL2-motatako proteinek?; (v) Zein da mintzak edo lipido espezifikoek BCL2 familiako proteinen funtzioan jokatzeko duten papera?; eta, (vi) Zein da BAX/BAK-ek eratutako poroaren natura eta zelan dago erregulatuta?

#### 1. Zelan doaz BCL2 familiako proteinak MOMera?

Zelula osasungarrietan, BCL2 familiako kide asko mitokondrioan aurkitzeaz gain, zitosolea, erretikulo endoplasmatikoa eta nukleoan ere aurkitu daitezke. BAX eta BAK proteinen lokalizazio zehatza ondo ezarrita dago, BAX batez ere zitosolikoa delarik BAK mitokondriala den bitartean, nahiz eta bi proteinen kantitate txikiak ERan ere aurki daitezken. Hala ere, BAX-motatako proteina den BOKen lokalizazio intrazelularraren inguruan eztabaida handia dago. Hasiera batean proteina zitosolikoa zela proposatu zen mitokondriari modu ahulean lotuta egon litekeena (Gao *et al.* 2005; Hsu *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 2010), berriki batez ere ERan eta golgi aparatuan kokatzen dela iradokitu da (Echeverry *et al.*, 2013). Proteina hauetako askok apoptosian zehar lokalizazioa aldatzen dute, MOMera translokaturik edo MOMean aberasturik agertuz, antza mintz horren permeabilizazioa bertatik erregulatzeko. Bestalde, BOKen kasuan mitokondriara translokatzeko den ez dago argi.

BCL2 proteinen mintzerako translokazioa azaltzeko zenbait mekanismo desberdin proposatu dira: 1) BCL2 familiako kideen C-mutur hidrofobikoaren txertaketa MOMean; 2) beste BCL2 familiako kideekin interakzionatzea; 3) BCL2 familiako kideak ez diren proteinek interakzionatzea, TOM/TIM konplexuak eta aldaketa post-translazioalak eragiten dituzten entzimekin besteak beste (Dorn & Maack, 2013), eta 4) mitokondriako osagai lipidikoekin interakzioa.

## 2. BAX/BAK iragazkortze funtzioaren erregulazioa

Zelula baten zoria, hau da bere biziraupena ala heriotza, erabakitzeko beharrezkoa den erregulazio maila altua BCL2 familiako kideen arteko elkarrekintza sare konplexu baten bidez lortzen da. Dagoeneko aski ezaguna da BH3-domeinu bakarreko proteinek beraien funtzio proapoptotikoa BAX-moduko proteinen bidez betetzen dutela, baita BCL-2-moduko proteinek, berriz, funtzio hori inhibitzen dutela (Cheng *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001). Halere, zelularen testuinguru desberdinetan gertatuko diren interakzio hauen hierarkia zehatzak eztabaidagarri izaten jarraitzen du. MOMP suertatzeko ala eragozteko, BAX eta BAK proteinak aktibatu edota inhibituko dituzten erreakzioen emaitzak erabakiorrak izango dira.

Zelularen heriotza ematen den edo ez BCL2 familiako proteinek euren arteko zein beste faktore zelular batzuekin osatutako interakzio sare konplexu baten bidez erabakiko dute. BH3-domeinu bakarreko proteinek bere funtzio proapoptotikoa BAX-motatako proteinetan deskargatuko dute, beraien aktibitatea BCL2-motatako proteinek ezabatuko duten bitartean (Cheng *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001). Hala ere, interakzio hauen hierarkia eta MOM faktoreen paperak zeintzuk diren eztabaidagarri izaten jarraitzen du.

Azken hamarkadetan batez ere soluzioan egindako proteina pro- eta antiapoptotikoen batuketa saioetan oinarrituz, itxuraz kontrajarriak diren bi modelo izan dira proposatuak: “Zeharkako aktibazio eredua” eta “Zuzeneko aktibazio eredua” deitutakoak. Azken urteotan bildutako ebidentzien arabera, modelo bakoitzaren aspektu jakin batzuk egokiak direla ezaguna da, baita MOMak berak ere BCL2 familiako kideen arteko elkarrekintza eta funtzioen erregulazioan paper garrantzitsu bat bete dezakeela ere. Honela, jarraian azalduko den moduan, MOMP eta apoptosiaren erregulazioan BCL2 familiako proteinen arteko interakzioek duten partaidetza azaltzeko hiru eredu existitzen dira gaur egun (1.25 irudia).

- Zuzeneko aktibazio eredua

Zuzeneko aktibazio ereduaren arabera, BAX-moduko proteinak BH3-domeinu bakarreko proteinek batuz aktibatuko dira, eta BCL-2-moduko proteinek, berriz, euren funtzio inhibitzailea BH3-domeinu bakarreko proteinek atxikiz beteko dute. Modelo hau BID BH3 eta BIM BH3 peptidoek, eta ez ordea BAD eta NOXA BH3 peptidoek, BAX/BAK-en mitokondrioaren iragazkortze funtzioa aktiba lezaketan azaltzeko izan zen proposatua (Kuwana *et al.*, 2005; Letai *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2000). Beraz, BH3-domeinu bakarreko proteinek bi klase desberdinetan bana daitezke: alde batetik, BAX/BAK zuzenean aktiba dezaketanak, “Zuzeneko aktibatzaileak” deituak, euren artean adibidez, tBID, BIM eta agian PUMA aurkituz; eta bestetik, BCL-2-moduko proteinetatik aktibatzaileak askatzeko gaitasuna duten proteinek edota BAX/BAK zeharka aktibatzen dituzten proteinek egongo dira, “sentikortzaileak” bezala ezagutzen direnak, esate

baterako, BAD edo NOXA. Eredu hau egiaztatuz, hainbat ikerketa-taldeek emaitzek tBIDek BAX/BAKen mintz lipidikoak iragazkortzeko funtzioa aktiba dezakeela adierazi dute (Bleicken *et al.*, 2010; Etchebarria *et al.*, 2008; Kuwana *et al.*, 2002; Landeta *et al.*, 2011a; Lovell *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2010; Terrones *et al.*, 2004).

Aitzitik, modelo honetan, zeharkako modeloan proposatzen zaien funtzioari kontrajarriz, proteina antiapoptotikoen funtzio nagusia BAX/BAKen funtzio propapoptotikoa eragozteko BH3-domeinu bakarreko zuzeneko proteina aktibatzaileak batzea dela egotzen zaie. Hortaz, deskribatutako bi ereduetan, BH3-domeinu bakarreko proteinek kide apoptotiko ezberdinak batuz burutuko dute apoptosiaren erregulazioa. BH3-domeinu bakarreko proteinen eta proteina antiapoptotikoen arteko interakzio patroia oso ondo izan da ezarria; ordea, BAX/BAKen zuzeneko aktibatzaileak zehazki zeintzuk diren oraindik eztabaidan jarraitzen duen gaia da. BH3-domeinu bakarreko peptidoen eta proteina antiapoptotikoen artean osatutako konplexuen adibideak hedatuak izan arren, BAX/BAK eta tBID-moduko zuzeneko aktibatzaileen arteko interakzioa aztertzea esperimentalki zaila izan da. Emaitza eta egitura gabezi honek BAX/BAKen aktibaziorako “ukitu eta ihes” mekanismoa proposaraztera eramanez, kasu honetan, BH3-domeinu bakarreko proteinek “ligandoak” izanik eta BAX-moduko proteinek “hartzaileak” (Dai *et al.*, 2011; Eskes *et al.*, 2000; Lovell *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2000). Hala ere, elkarrekintza hau deskribatzen zuten artikulu gutxi batzuk bakarrik izan ziren argitaratuak: alde batetik, FRET (ingelesez, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) espektroskopia bidez liposometan emandako BAX eta tBIDen arteko elkarrekintza egonkor bat deskribatu zen (Lovell *et al.*, 2008); bestalde, kimikoki eraldatuta dagoen BIM BH3 peptido bati lotutako BAXen egitura izan zen deskribatua baita ere (Gavathiotis *et al.*, 2008). Azkenik, fluoreszentsia konplementazio teknika erabiliz BH3-domeinu bakarreko proteina eta BAX-motatako proteinen arteko elkarrekintzak ere deskribatu izan dira (Vela, Gonzalo, Naval, & Marzo, 2013).

- Zeharkako aktibazio eredua:

Zeharkako aktibazio modelo honen arabera, BCL-2-moduko proteinek BAX-moduko proteinei batuta azalduko dira aldi oro, BH3-domeinu bakarreko proteinek BCL-2-moduko kideak batu eta neutralizatzeko ahalmena izango dute. Modu honetan, BAX-moduko proteinek aske geratuz MOMP eragin ahal izateko (Chen *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2005).

Zeluletan ikusitako BH3-domeinu bakarreko proteinek eragindako heriotza tasa desberdinen azalpen posible batek BH3 peptidoen eta BCL-2-moduko proteinen arteko batuketa afinitate ezberdinean datza. BIM, PUMA eta tBID kideek proteina antiapoptotiko guztiak batzen dituzten arren, gainontzeko BH3-domeinu bakarreko proteinek BCL-2-moduko proteina jakinekin bakarrik elkartuko dira. Adibidez, NOXAK MCL-1 eta A1 proteinek bakarrik batzen ditu, BADek, aldiz, BCL-xL, BCL-2 eta BCL-w batzeko gaitasuna azaltzen duen bitartean. Hori dela eta, proteina

antiapoptotiko guztiak batzeko gaitasuna daukaten BH3-domeinu bakarreko proteinak (BIM, PUMA eta tBID) gainontzekoak baino hiltzaile indartsuagoak direla esan daiteke, nahiz eta, adibidez, NOXA-BAD konbinazioak zelulen heriotza egoki bat eragin dezakeen ere (Chen *et al.*, 2005).

Eredu honen beste postulatu batek dio, ordea, BAX-moduko proteinak egituralki aktibatuta egongo direla, baina BCL-2 moduko proteinei batuz inhibituta mantentzen direla baldintza ez apoptotikoetan. Beraz, BAX-moduko kideek proteina antiapoptotikoetatik askatuz burutuko lukete MOMP prozesua. BAK MOMeko proteina integrala izanik, MCL-1 eta BCL-xL proteinez gain tentsio-menpeko kanal anioniko mitokondrialak (VDAC, ingelesetik *Voltage-Dependent Anion Channel*) ere batzen dituelako, inhibituta dagoela proposatu da (Cheng *et al.*, 2003; Willis *et al.*, 2005). Eredu hau indartuz, BAXen BH3 domeinuan BCL-2-moduko proteinen batuketak eragozten duten mutazio puntual batzuk eraginez, kontrol-gabeko apoptosis eragiten dutela ikusi izan da (Czabotar *et al.*, 2011; Fletcher *et al.*, 2008). Hala ere, zeharkako aktibazio modelook zailtasunez azal dezake, *in vivo* saioetan aztertutako BAX/BAKen frakzio txiki bat agertzea soilik proteina antiapoptotikotara atxikituta. Eredu honen beste arazotariko bat BAX/BAK batzeko gaitasuna galdu duten BCL-2-moduko proteina mutanteek, zelularen heriotza guztiz inhibititu dezaketela ikustea da. Azkenik aipatu beharrekoa da, oraindik ez dela zorrozki egiaztatu BAX edo BAK beste faktore mitokondrialen gabezia autoaktibatu daitezkeen.

- Mintz ereduak

Eredu berriek, apoptosisen zehar BCL2 familiako proteinen arteko elkarrekintza sarean MOMak izan dezakeen eginkizuna azpimarratzen dute (Basañez & Hardwick, 2008; Billen *et al.*, 2008; Leber *et al.*, 2010; Leber *et al.*, 2007). “Mintzean barneraturiko eredu”-aren arabera BCL2 familiako proteinak mintzera batzeak hauen konformazio aldaketa bat eragin dezake, honela, proteina hauen arteko elkarrekintzak ere aldatzeko aukera azalduz. Aurkikuntza berri batzuek diotenez, mintzean BCL-xL proteinen tBIDekiko afinitatea altuago da; honez gain, mintz baten presentzia guztiz beharrezkoa da tBIDek BAXekin interakzio bat eduki ahal izateko (García-Sáez *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012).

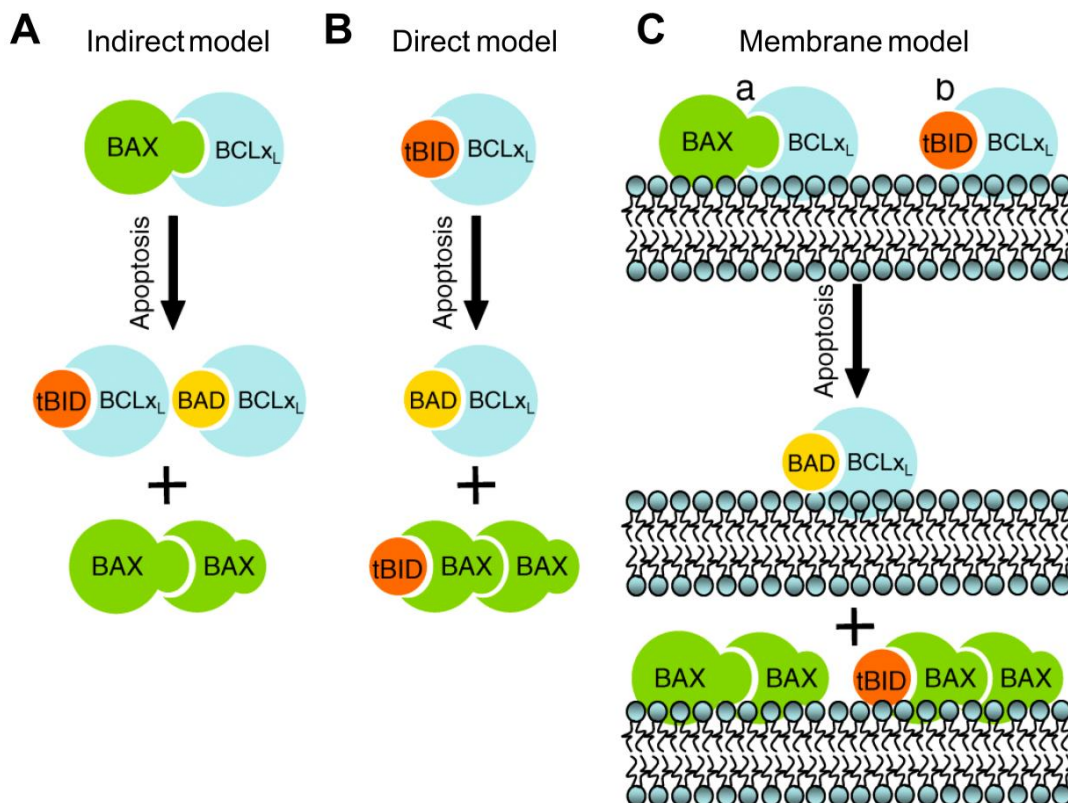
Halaber, BH3-domeinu bakarreko proteinek BAX/BAKen zuzeneko aktibatzaile gisa funtzionatzeaz gain, proteina antiapoptotikoen funtzioa aktibatu edo inhibititu dezakete. Era honetan, BH3-domeinu bakarreko proteina sentikortzaileek antiapoptotikoen biziraupen funtzioa inhibititu dezakete euren barrunbe hidrofobikoa batuz. Bestalde, bere ondorio fisiologiko argia zein den ez jakin arren, proteina apoptotikoak BH3-domeinu bakarreko proteinek bideratutako eta funtzio antiapoptotikoa galarazten ez dion  $\alpha 5$  helizearen mintzeko txertaketa dakarten aldaketa konformazionalak jasan ditzaketela ezaguna da (Dlugosz *et al.*, 2006; Leber *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2006). Honen adibide, BCL-xLek BAXen modu antzekoan

funtzionatzen duenez prozesuaren pausu guztietan beraien arteko lehia bat sortuko da. Hortaz, kontzeptualki BCL-xLeren portaera, BAXen gainartzaile negatibo baten modukoa dela esan izan da (Billen *et al.*, 2008).

Honetaz gain, eta tBID kimera ezberdinek BCL-2 moduko proteinekiko dituzten afinitate erlatiboen azterketan oinarrituta, "Eredu bateratua" izeneko modeloa deskribatu da. Bi motatako inhibizio elkarrekintza mota zehaztu dira MOMean kokaturiko proteina proapoptotiko eta antiapoptikoen arteko interakzioen arabera: proteina antiapoptotikoek BH3-domeinu bakarreko proteina aktibatzaileak batzekoa alde batetik (1. go MODUA) edo aktibatutako BAX/BAK<sub>i</sub> atxikitzea bestetik (2. MODUA). Bi inhibizio mekanismo modu hauek MOMP eragozteko gaitasuna izango dute, BAX/BAK<sub>i</sub> atxikitzea BH3-domeinu bakarreko proteinek batzea baino eraginkorragoa izanik beti ere (Llambi & Green, 2011). BAX proteinak, behin BH3-domeinu bakarreko proteinek aktibatuta, beste BAX molekula batzuk aktibatzeko ahalmena izango duela kontuan hartuz (Gavathiotis *et al.*, 2010), auto-aktibazio prozesu honen inhibizioa (2. MODUA) BH3-domeinu bakarreko proteinen batzea baino eraginkorragoa izango dela aurreikusi daitekeen aspektua da (Llambi & Green, 2011).

Bukatzeko, MOMaren lipido konposaketa BCL2 familiako proteinen arteko elkarrekintzen erregulazioan aspektu garrantzitsu bat izan daitekeela gero eta onartuagoa da (Chipuk *et al.*, 2012a; Landeta *et al.*, 2011; Terrones *et al.*, 2004, 2008). Behaketa hauetan oinarrituz, mekanismoaren "Eredu lipozentriko" bat proposatu liteke, zeinetan apoptosiarekin erlazonaturiko lipidoek BCL2 familiako kideen aktibazioa eta funtzioa modula dezakete mintz mailan, bai interakzio zuzen baten bidez (Chipuk *et al.*, 2012; Landeta *et al.*, 2011), zein lipido geruza bikoitzean eragindako efektu (Basañez *et al.*, 2012) desberdinen bidez. Azken efektu honi dagokionez, BH3-domeinu bakarreko proteinek BAX-moduko kideen funtzioaren bultzatzea proteina:proteina interakzio zehatzen bidez emateaz gain, proteina:lipido elkarrekintzek mintzean eragindako propietate fisikoen aldaketen bidez eman dezakeela pentsa liteke (Gorka Basañez *et al.*, 2002; Terrones *et al.*, 2004): behin mintzera batuta egonik, helize anfipatikoek lipido geruza bikoitzen propietateak alda litzakete, esate baterako, honen kurbadura intrintsekoa eta malgutasuna; azken aldaketa hauek, berriz, proteinen aldaketa konformazionalarekin erlazonatzen den lipido geruza bikoitzaren deformazio energia aldatu lezakete (McIntosh & Simon, 2006). Honez gain, lipidoen bidezko BCL2 familiako proteinen erregulazioak dinamika mitokondrialarekin lotuta egon liteke baita ere (Basañez *et al.*, 2012; Etxebarria *et al.*, 2009; Montessuit *et al.*, 2010).





**1.25 Irudia.** BAX/BAKen mintza iragazkortzeko funtzioaren erregulazioa deskribatzeko proposatu diren ereduaren eskema. BCL2 familiako proteina desberdinen ordezkariak honako hauek dira: proteina antiapoptotikoa BCL-xL (urdina), domeinu-anitzeko proteina proapoptotikoa BAX (berdea), BH3-domeinu bakarreko proteina sentikortzaileena BAD (horia) eta aktibatzaileena tBID (gorria). **A)** “Zeharkako aktibazio eredu”-an, BH3-domeinu bakarreko proteinek BCL-xL batzen dute honela BAX askatuz; modu honetan, BAX bestelako proteinen gabezia autoaktibatze gai izango da. **B)** “Zuzeneko aktibazio eredu”-aren arabera, BH3-domeinu bakarreko proteinak bi taldetan bana daitezke: proteina aktibatzaileak (hemen tBID), berez antiapoptotikoetara batuta daudenak, behin proteina sentikortzaileengatik ordezkatuak direnean BAX edo BAK zuzenean aktibatze aukera izango dute. **C)** “Mintz eredu”-an, mintza BCL2 familiako proteinen elkarrekin erregulazio faktore bat izango da (Basanez eta Hardwick 2008)-tik moldatua.

### 3. BAX eta BAKen konformazio aldaketak aktibazioan zehar

BAX-moduko proteinek apoptosi prozesuan jasaten duten aldaketa konformazioanalaren ulermena, hots, euren egoera inaktibotik MOMP-eragilea den egitura guztiz aktibo baterako ematen den aldaketaren ulermena apoptosi ikerketaren “Grial Santua” bezala izan da kontsideratua (Youle & Strasser, 2008). Berriki, aurkikuntza berriek BAX-motatako proteinen mintz mailako aktibazio funtzionalak eragiten dituzten egitura aldaketen eta mekanismo molekularren inguruko informazioa eskeini digute (Czabotar *et al.*, 2013; Moldoveanu *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013) (1.26 Irudia).

Atal honetan, BAX-moduko proteinen aktibazio prozesuaren ustezko pausuetan gerta litezkeen egitura aldaketak xehatuko ditugu: 1) Aktibazio pausu goiztiarrak (N-muturraren eta BH3 domeinuaren azaleratzea); 2) Mintzean txertaketa eta 3) Oligomerizazioa edo txertaturiko monomeroen arteko hurbiltasunaren areagotzea.

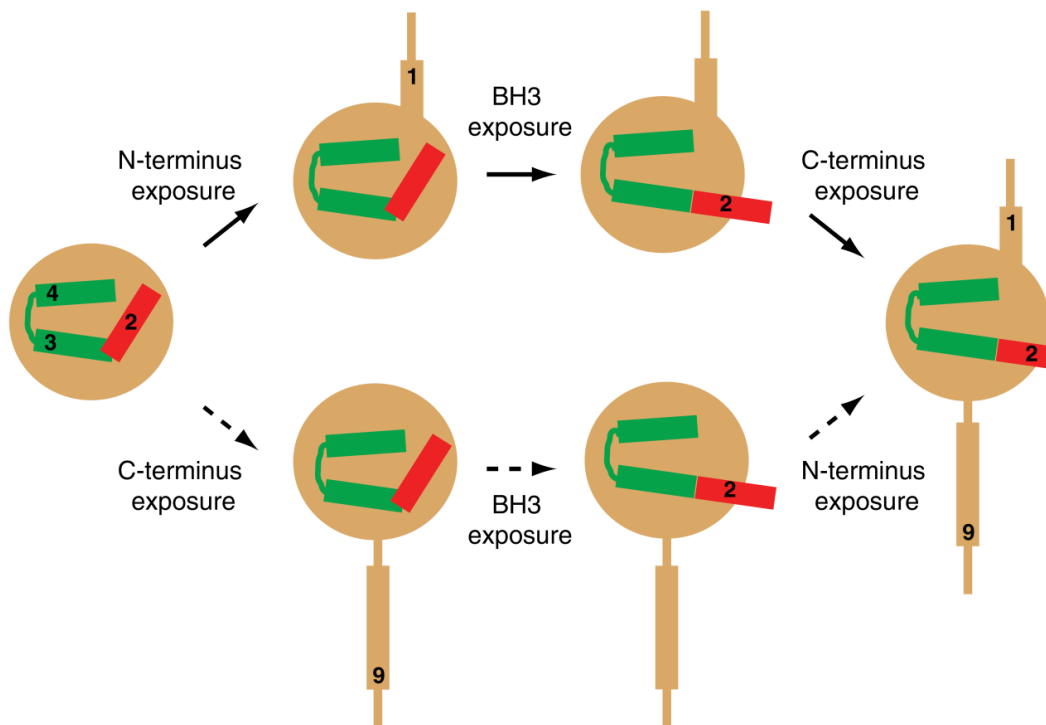
#### 1) Aktibazio pausu goiztiarrak

Zenbait ikasketa estruktural eta biokimikoek, behin apoptosia kitzikatuta, BAX eta BAK proteinen hainbat eremuk egitura aldaketak jasan ditzaketela egiaztatu dute. Ereku aldakor hauen artean N-muturra, BH3 domeinua eta barrunbe hidrofobikoa azalduko dira. Honetaz gain, eta aurretik azaldua izan den moduan, BAXen kasuan gune hidrofobikotik bere C-muturraren askapena gertatzea beharrezkoa da baita ere (1.26 Irudia).

- N-muturraren azaleratzea

BAX eta BAKen N-muturrek N-zatikia eta  $\alpha 1$  helizea deituriko bi eremu dituzte. BAXen N-zatikia (1-15 aminoazidoak) malgua da, eta soluziorantz begira azaltzen da (Suzuki *et al.*, 2000). BAKen kasuan, berriz, zatiki hau (1-23 hondarrak) desegituratuta dago eta, bere mozketak eraginik ez duenez, badirudi ez daukala eragin zuzenik proteina funtzioan edota egonkortasunean (Grant Dewson *et al.*, 2009). Apoptosian zehar, BAX eta BAKen N-muturrek egitura aldaketak pairatuko dituzte,  $\alpha 1$  helizeak bere kokapena guztiz biratu edo helize maila murriztu dezakeelarik. Zeluletan burututako saioetan, konformazio aldaketa hau BAX eta BAKen aktibazio pausu goiztiarra detektatzeko markatzaile gisa izan da erabilia (Dewson & Kluck, 2009; Dewson *et al.*, 2008b, 2009b; Kim *et al.*, 2009; Lalier *et al.*, 2007; Nechushtan *et al.*, 1999).

Emaitzarik argienak proteinen konformazio zehatzak espezifikoki ezagutzen dituzten antigorputzen erabileran oinarritzen dira agian. Antigorputz hauek, 6A7/49F9 antigorputza BAXentzako eta Ab-1 antigorputza BAKentzako, aldaketa konformazional baten ondorioz euren epitopoaren azaleratzea ematean soilik ezagutuko dute proteina (Czabotar *et al.*, 2013; Dewson *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Honez gain, aurretik deskribatutako datu hauek EPR teknika bidez egindako BAX eta BAKen egituren azterketa erabiliz izan da indartua: behin tBIDek aktibatuta,  $\alpha 1$  helizea gainontzeko BAX/BAK egituratik askatzen da,  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  begizta irekiz (Bleicken *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2010). N-muturraren azaleratzea BAX/BAK egitura aktiboarekin erlazionatu izan den arren, mutagenesi azterketen bidez BAX/BAK egitura aldaketa hau, kinada apoptotiko edota oligomerizazio prozesu baten gabezia ere pairatu dezaketela ikusi da. Hortaz, esan daiteke N-muturraren azaleratzea BAX/BAK oligomerizazio prozesuarekin inolako zerikusirik ez duen aktibazioaren pausu goiztiar bat izango dela (Dewson *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009) (1.26 Irudia). Hala ere, lan berri batek N-muturraren azaleratzea BAKen BH3 domeinuaren azaleratzearekiko independentea eta kronologikoki ostean gertatzen dela deskribatu du (Weber *et al.*, 2013).



**1.26 Irudia. BAX proteinaren kasurako aktibazio goiztiarraren pausua azaltzeko proposaturiko bi modeloen eskema.** BAX proteinaren egitura ez-aktibatua laranjaz koloreztatutako egitura globular bat bezala adierazten da, zeinatan BH3 domeinua ( $\alpha 2$ ) gorritz eta gune kanonikoa ( $\alpha 3$ - $\alpha 4$ ) berdez agertzen diren. BH3-domeinu bakarreko proteina aktibatzaileak BAX gune ez kanonikoan batuz aktibatzen du (gezi osoak), honen ondorioz, BAXen gune N-terminala ( $\alpha 1$ ) azaleratzen da eta jarraian BH3 domeinua. Azkenik, egitura aldaketa goiztiar hauek BAXen C-muturreko askapena eragiten dute. Beste modeloan (puntutako gezia), berriz, pausuen sekuentzia kontrajarria izango da. Kasu honetan, lehendabizi BAXen C-muturra gune kanonikotik askatu behar da, bertara BH3-domeinu bakarreko proteina bat batzeko eta aktibatua izateko. Ondoren, BH3 domeinua azaleratzen da eta jarraian N-muturra. Eskema honetan  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  urkilaren txertaketa ez dago adierazita. Bukatzeko, BAK proteinak antzeko konformazio aldaketak pairatu litzakeela aipatu beharra dago. (Westphal *et al.*, 2011)-tik hartutako irudia.

BAXen kasuan, eta honen N-muturreko azaleratzea bere mitokondrionarako txertaketarekin erlazionatuz,  $\alpha 1$  helizeak  $\alpha 9$ ren barrunbe hidrofobikorako batuketa egonkortzen duela deskribatu da (Kim *et al.*, 2009; Nechushtan *et al.*, 1999). Ordea, ikerketa lan berri batek BAXen MOMerako ainguratzea bere N-muturraren azaleratzeak eragiten duen proteinaren aldaketa konformazionala baino lehenago gertatzen dela deskribatu du. Honez gain, lan berdinak BAX MOMean txertatutako egoera horretan egonda etengabe zitosolera erretrotranslokatu daitekeela adierazi du, baina ez ordea N-muturreko egitura aldaketa gertatu ostean (Schellenberg *et al.*, 2013). Aldiz, liposometara batuta baina ez txertatuta dagoen BAXek, N-muturreko zatikia erakusten du apoptosiaren estimulurik egon gabe (Yethon *et al.*, 2003). Bestalde, eta bukatzeko, berriki deskribatu da nahiz eta BID BH3 peptidoa BAKen barrunbean

kokatuta egon, BAKen N-muturraren eta BH3 domeinuaren esposizioa eman ahal izateko, BID BH3:BAK konplexu hau lipido ingurune batean aurkitu behar dela (Moldoveanu *et al.*, 2013).

- BH3 domeinuaren azaleratzea

Aurretik aipatu den bezala, apoptosia aktibatu baino lehen, BH3 domeinua ( $\alpha 2$  helizea) BAX/BAK en egituraren muinerantz begira kokatuta dago (Moldoveanu *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2000). BH3 domeinua beharrezkoa izanik oligomerizazioa gertatu dadin, domeinu honen azaleratzea BAX/BAK en aktibazioaren funtsezko pausu bat da. BH3:barrunbe eredian oinarrituz, BH3 domeinuaren esposizio iragankor bat gertatu behar da hau beste proteina baten barrunbean sartu ahal izateko: azken proteina hauek BAX edo BAK baldin badira, oligomerizazioa burutuko da; proteina antiapoptotiko baten kasuan, ordea, BAX eta BAK inhibituko dira (Dewson *et al.*, 2012; Dewson *et al.*, 2008; George *et al.*, 2007; George *et al.*, 2010; Sattler *et al.*, 1997; Simonen *et al.*, 1997; Whelan *et al.*, 2012; Willis *et al.*, 2005). Gainera, BH3 domeinua antigorputz bati lotuta egoteagatik ematen den proteinaren blokeoak bere oligomerizazioa eta ondorengo *c*-zitokromoaren askapena eragozten duela ikusi da (Bleicken *et al.*, 2010; Czabotar *et al.*, 2013; Dewson *et al.*, 2012; Dewson *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2013).

## 2) BAX eta BAK en txertaketa mintzean

BAX eta BAK en aktibazio funtzionalaren prozesuan barna, proteina hauen helize zatikien mintz lipidikoan txertatzea dagoela deskribatu da. Mintz mikrosomalak erabiliz *in vitro* burututako glikosilazio saioetan, BAX en egitura  $\alpha 1$  eta  $\alpha 9$  helizeak eta  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  urkila, baina ez  $\alpha 6$  helize bakuna, mintzean txertatuta daudela ikusi da (García-Sález *et al.*, 2004). Isolatutako mitokondrioetan egindako zisteinen eskuragarritasun saioetan, antzeko emaitzak lortu ziren bai  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  urkila zein C-muturreko domeinuarentzat ( $\alpha 9$ ) (Annis *et al.*, 2005). Gaur egun, oro har, onartua dago erdiko helize urkila ( $\alpha 5$ - $\alpha 6$ ) eta C-muturreko zatikia ( $\alpha 9$ ) BAX aktibazioan zehar lipido geruza bikoitzean txertatzen direla. Arestiko beste ikerketa batzuk, ordea, gainontzeko proteinaren tolestura globularra mantentzen den bitartean, txertatzen den gune bakarra C-muturreko domeinua dela iradokitzen dute (Dewson & Kluck, 2009).

Bestalde, azken BAX en forma aktibatu baten egituraren azterketa batek honen  $\alpha 4$ - $\alpha 5$  eta  $\alpha 6$ - $\alpha 8$  helizeak mintzaren azaleraren planoan kokatuta egon daitezkeela deskribatu du, proteinaren zatiki hauek MOMaren lipido buruen artean aurkituko lirakekeela proposatuz (Czabotar *et al.*, 2013). Erdiko helize urkilak mintzean aurkeztu dezakeen topologia oraindik eztabaidagai den aspektu bat da. Erdiko  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  urkila poroa eratzeke domeinua bezala deskribatu izan da, baita mintza zeharkatzen duen domeinu gisa irudikatu ere. Ordea, helize zatiki hauen luzera hidrofobikoaren arabera ezingo lukete mintz osoa zeharkatu; ondorioz mintzean euren hondar hidrofobikoak lipido geruza bikoitzaren interfasean okluituz koka litezkeela proposatu da.

Zisteinen elkargurutzatzearen bidez lortutako emaitza berri batzuen arabera, aktibazio pausu goiztiar batean  $\alpha 5$  eta  $\alpha 6$  helizeak elkarbanandu eta orientazio ezberdinak hartu ditzaketela proposatu da (Czabotar *et al.*, 2013). Horrez gain, nahiz eta BAX txertaketara bideratzen duten gertaeren sekuentzia zehatzak ezezagun izaten jarraitzen duen, ikerketa lan desberdinek txertaketa hau proteinaren oligomerizazioa eta mintzaren zulaketa baino lehenago, baina BAX:tBID interakzioa eman ostean, gertatzen den prozesu bat bezala deskribatzen dute (Annis *et al.*, 2005; Lovell *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2013),

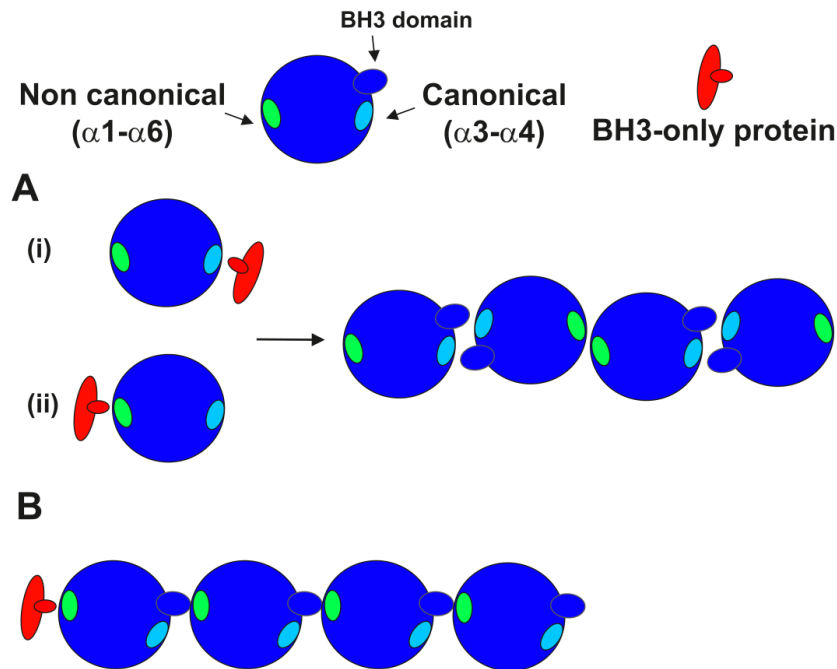
### 3) Oligomerizazioa

Gaur egunera arte, BAX eta BAKen BH3:barrunbe interakzio bidez bultzatutako oligomerizazioa elkargurutzatze saio ezberdinak burutuz izan da deskribatua. BAX/BAK en domeinuaren azaleratzea, BH3-domeinu bakarreko proteina batekin interakzionatzerakoan, tBIDekin esaterako, emango da; ostean, domeinu horrek beste aktibatutako BAX/BAK molekula baten barrunbea batuko du, BH3:barrunbe dimero bat eratuz (Bleicken *et al.*, 2010; Dewson *et al.*, 2012; Dewson *et al.*, 2008b, 2009b; Oh *et al.*, 2010). Datu hauek berriki argitaratutako BAXen BH3:barrunbe dimero simetriko baten emaitza egiturekin bat egiten dute (Czabotar *et al.*, 2013). Azken ikerketa lan honetan, BAXen  $\alpha 2$ - $\alpha 5$  zatikiak dimero bat eratzen du, zeinetan BAXen monomero bakoitzaren  $\alpha 2$  helizeak (BH3 domeinua) beste monomeroaren  $\alpha 3$ - $\alpha 5$  eremua batzen duen. BAXen dimeroaren egitura kristalino honek, gainera,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  eta  $\alpha 5$  helizeak oligomerizazioa gertatzeko beharrezkoa den egitura minimoa osatzen dutela proposatzen duen lana sostengatzeko balio izan du (George *et al.*, 2007). Ondoren, BAX/BAK en oligomero handiagoak eratu daitezkeela ikusi da BAX/BAK proteinen beste elkarrekintza eremua den  $\alpha 6$  helizearen baturagatik (1.27 Irudia) (Dewson *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013).

Haatik, BAX/BAK en auto-aktibazio modeloan oinarrituz BAXen oligomerizazio prozesua azaltzen duen "buru-isats" edo eredu asimetrikoa izan da proposatua (Bogner *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Eredu honetan, hasteko BH3-domeinu bakarreko proteinek BAXen gune ez-kanonikoa batuko dute (Gavathiotis *et al.*, 2008); ondoren, aktibatutako BAX molekula honek beste BAX molekula baten barrunbe ez-kanonikora batuz hau aktibatuko luke, modu honetan oligomero handiagoen hedaketa bideratuz (1.27 Irudia). Hala ere, esan beharrezkoa da eredu honek ezin duela BAK en oligomerizazioa azaldu, izan ere, BAK en egiturak gune hidrofobiko bakarra azaltzen du, barrunbe kanonikoa (Leshchiner *et al.*, 2013).

Bukatzeko, ikerketa berri batek oligomerizazioa mintzaren zulaketa emateko beharrezkoa den ala ez planteatu du. Newmeyer eta lankideek, berreraikitako sistemak erabiliz poro eraketa gertatzeko BAXen oligomerizazioaren pausua ezinbestekoa ez dela deskribatu dute (Kushnareva *et al.*, 2012). Azkenik, beste artikulua batean, "nanodisc" sistema batean txertaturiko BAX molekula bakar batek eratutako poroa erakutsi da (Xu *et al.*, 2013). Beraz, BAX/BAK en

oligomerizazioa eta hauek bideratutako mintzaren zulaketaren arteko loturak argitzeke egoten jarraitzen du.



**1.27 Irudia. BAXentzako proposaturiko aktibazio eta oligomerizazio modeloak.** BAX molekularen irudikapena urdin ilunez adierazten da, gune ez kanonikoa berdez, gune kanonikoa urdin argiz eta BH3 domeinua borobil urdin batez. BH3-domeinu bakarreko proteina, berriz, gorritz adierazita dago. A) BH3:barrunbe interakzio bidezko oligomerizazioa edo oligomerizazio simetrikoa. Deskribatutako modeloen arabera, BH3-domeinu bakarreko proteinak BAXen gune ez kanonikoa edo gune kanonikoa batzerakoan, BH3 domeinuak azaleratzeko aukera izango du. Modelo honetan eratzen diren dimeroak BH3 domeinuaren eta barrunbearen arteko elkarrekintzan oinarritzen dira, honetaz gain, oligomero handiagoak eratu daitezkeelarik elkarrekintza eremua den  $\alpha 6$  helizearen baturagatik ere. Hortaz, oligomerizazioa bi eremu ezberdinen bidez gertatuko da kasu honetan. B) “Buru-isats” bidezko oligomerizazioa edo oligomerizazio asimetrikoa. Auto aktibazio modeloan oinarrituz, BH3-domeinu bakarreko proteinak BAXen gune ez-kanonikoa batzen du, BAXen BH3 domeinua azaleraraziz; ondoren BAXen BH3 domeinu honek beste BAX baten barrunbe ez kanonikoa batuko du, azken honen BH3 domeinua azaleraraziz. Modu honetan oligomero handiak eratu daitezke.

4) Poro eraketa.

Gaur egun, BAX eta BAK MOMP-eragileak direla ongi finkatuta dagoen arren, hauek mintzean eratuko dituzten zuloen izaerak oso eztabaidatua den gai bat izaten jarraitzen du. BAX-moduko proteinek MOMP nola eragiten duten azaltzeko bi taldeetan banandu ahal diren eredu desberdinak izan dira proposatuak: poro eraketaren zeharkako eredu eta zuzeneko eredu.

## 1. Poro eraketaren zeharkako eredua

Modelo honen arabera, mitokondrioan dauden kanal endogenoak BAX-moduko proteinek erregulatzen dituzte. Honela, BAXek kanpo eta barne mintzeko elkarguneetan (CS, ingelesetik *Contact Sites*) kokatzen den mPTP-ren (ingelesetik *Permeability Transition Pore*) osagaiekin elkarrekintza zuzen bat dela medio mitokondrioaren kanpo mintza zulatzeko ahalmena izango du (Kroemer *et al.*, 2007). mPTP konplexu honen osagaiak honako hauek direla proposatu da: adenina-nukleotido translokasa (ANT, barne-mintzean kokatua), kanpo mintzean txertatua dagoen VDAC proteina, eta D-ziklofilina (Cyp-D, barne-mintzeko matrizearen azalera kokatua) (Baines *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2004). Konplexu honen zabaltzeak mitokondrioaren matrizerara ur eta ioien fluxu aske bat ahalbideratuko luke, hortaz, organuluaren hantura eta MOMaren apurketa eraginez.

Ikerketa-lan osagarri batzuen emaitzetan oinarrituta, hipotesi honen inguruko zalantza desberdinak planteatu dira. Ikusi denez, mPTP-ren ustezko osagai bakoitzaren *knockout* saioek ezagutarazi dute hauek ez direla MOMP edo apoptosia eragiteko nahitaezkoak, nahiz eta, aipatzen den moduan, ezin den baztertu mPTPak eragiten duen MOMP prozesua nekroptosi mekanismoarekin erlazionatuta egon litekeela (Baines *et al.*, 2005; Baines *et al.*, 2007; Kokoszka *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Whelan *et al.*, 2012). Bestalde, mPTPak MOMP eragiteko proposatu den mekanismoa mitokondrioaren matrizearen hantura izanik, aipatu beharrekoa da hau ez dela apoptosian zehar gertatu ohi den prozesu bat. Hala ere, aurkikuntza berri batzuek iradokitzen dute mPTP-ren benetako osagaia ATPasa dimerikoa dela, eta beraz, ezin da guztiz baztertu BAX-moduko proteinen eta ATPasa dimerikoaren akzio koordinatu bat izatea MOMP-eragilea (Giorgio *et al.*, 2013). Azkenik azpimarratu beharrekoa da, mintz-eredu sistema sinplifikatuak (adib. berreraikitako proteoliposomak edo *black lipid* mintzak) erabiliz deskribatu den BAX eta BAKen mintz-iragazkortze funtzioa zeharkako eredu honetan oinarrituz ezinezkoa dela azaltzea.

## 2. Poro eraketaren zuzeneko eredua

Ordezko eredu honetan, BCL2 proteinen eta poro-eragile diren bakterio toxinen arteko antzekotasun egituraletan oinarrituz, BAX-moduko proteinek, MOMaren iragazkortasuna eragiteko ahalmena dutela proposatu zen (Petros *et al.*, 2004). Honez gain, gure eta beste talde batzuek mintz-eredu sistema desberdinetan eta beste mitokondrioaren osagirik egon gabe, tBIDek aktibatutako BAX eta BAKen bidezko poroaren mekanismoa aztertu dute (Basañez *et al.*, 1999; Basañez *et al.*, 2002; Bleicken *et al.*, 2010, 2013; Kuwana *et al.*, 2002; Landeta *et al.*, 2011; Martinez-Caballero *et al.*, 2009; Saito, *et al.*, 2000; Schafer *et al.*, 2009; Terrones *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2013). Aurretik aipatua izan den moduan, ikerketa-lan ezberdinek erdiko helize urkila ( $\alpha$ 5- $\alpha$ 6) poro eraketarako egitura minimoa dela proposatzen dute. BAXi  $\alpha$ 5- $\alpha$ 6 kentzeak BAX bidezko





- Poro proteolipidikoa

Poro proteolipidikoa 23 hondarretako magainina, peptido antimikrobianoaren ekintza-mekanismoa azaltzeko proposatua izan zen lehendabiziko aldiz (Ludtke *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1996). Egiturari begira, poro toroidala upa-ohol eredutik desberdintzen duen ezaugarria honako hau da: peptidoak lipido geruza bikoitzaren fase hidrofiliiko eta hidrofobikoen arteko tartean, hau da, lipidoen buruen artean kokatzen dira, baina mintzaren planoarekiko paraleloa den orientazio batean egokituz (1.28 Irudia). Peptido helikoidalen mintzeko txertaketa asimetrikoaren bidez, hots, peptidoa kanpo monogeruzan soilik txertatzearen ondorioz mintzaren ezaugarri fisiko desberdinak aldatuko dira, mintzaren azalera asimetrikoaren hedapena eta mintzaren zabaleraren hertsidura emanez. Behin mintz-tentsio maila batera helduta, lipido geruza bikoitzaren egitura ezegonkorra bihurtzen da, honela, mintzean sortu berri diren akatsetan peptido gehiago batu ahalko da, honek poro bat eratzeko energi-atalasea murriztuz. Poroa eratzen denean lipidoak kurbadura handiko egitura bat eratuz tolestean dira; hemen, mintzaren kanpo eta barne geruzak jarraiak bihurtzen dira, honela zulo toroidal bat eratuz. Monogeruzak kontaktuan daudenez, egitura jarrai bat eratuko dute; monogeruzaren kurbadura positiboa izango da mintzarekiko perpendikularra den planoan eta negatiboa berriz, mintzaren planoan. Hasierako poro honen tamaina handia izango da, baina behin peptidoak porotik igaro eta barne monogeruzan txertatzean lortutako oreka egoera honetan poroaren tamaina murriztu egingo da, bai poroa ixtea faboratzen duen tentsio lineala murriztuz, monogeruza lipidikoaren kurbaduran eraginez edota poroaren ertzean lokalizatuz (Fuertes *et al.*, 2011; Fuertes, *et al.*, 2010; Huang, 2000; Matsuzaki *et al.*, 1996; Valcarcel *et al.*, 2001).

Azkenengo urteetan, beste talde batzuek, gureak barne, BAXek proteina-lipidodun izaerako poro toroidal bat eratzen dutelaren ebidentzia ugari bildu dituzte. Alde batetik, BAXek mintzaren planoaren erdibizitza murrizten duela ikusi da, baita eratutako poroen konduktantzia mailak aldakorrak direla ere (Basañez *et al.*, 1999; García-Sáez *et al.*, 2005). Gainera, mintzaren konposaketa lipidikoan kurbadura intrintseko ezberdineko lipidoak gaineratuz BAXen poroaren ezaugarriak aldatzen dira (Basañez *et al.*, 2002; Terrones *et al.*, 2004). Bestalde, X-izpi bidez BAX  $\alpha 5$  peptido batek lipido molekula poroaren lumenean kokatzen diren poroak era ditzakeela frogatu zen (Qian *et al.*, 2008) (1.28 Irudia). Azpimarratzeko da, aurreko datu hauek BAXek poro eraketan eragindako monogeruza batetik besterako lipidoen mugimendurekin bat datozela (Epanand *et al.*, 2003; García-Sáez *et al.*, 2006; Terrones *et al.*, 2004).

Horretaz gain, BAXek liposometatik pisu molekular altuko proteina markatzaileen askapena eragiten dute (Bleicken *et al.*, 2010; Kuwana *et al.*, 2002; Schafer *et al.*, 2009; Terrones *et al.*, 2004, 2008). Proteina honekin inkubatutako liposomen Crio-EM bidez lorturiko irudien azterketak, mintzean tamaina ezberdineko (25-100 nm) zuloak eratzen direla erakusten ditu.

Gainera, poro hauen ertzetan ez zen kanal bat eratzen duten toxinen kasuan azaltzen den proteinadun egitura zehatzik aurkitu (Tilley *et al.*, 2005).

Deskribatutako modeloez gain, duela gutxi mintzaren birmoldatzea eragiten duten proteinek poro apoptotiko eraketan izan ahal duten parte hartzeari garrantzi handia ematen hasi zaio. Newmeyer eta lankideen arabera, MOMean kokatzen den katalizatzaile multimeriko batek BAXen poro eraketa kitzikatuko du. Eredu honetan, katalizatzaile horrek BAXen poro apoptotikoa eratzeko erabiltzen duen mekanismo zehatza zein den ez dago xehatuta, baina mintza birmoldatzeko ahalmena duen proteina bat proposatu da ustezko katalizatzaile multimeriko gisa. MOMean lokalizatzen diren DRP1 eta BIF1 mintza birmoldatzen duten bi proteina dira, eta mintzaren kurbadura aldatuz BAXen funtzio apoptotikoa faboratu dezaketela ikusi da (Etxebarria *et al.*, 2009; Montessuit *et al.*, 2010).

Guzti hau jakinda ere, BAX-moduko proteina hauen ekintza-mekanismo molekularrean berebiziko garrantzia duten hainbat aspektu ezberdin argitzeke geratzen dira, adibidez, BAX/BAK en poroak erregulatzen duten parametroak zeintzuk diren eta BAX/BAK en poroaren izaera zein den edota oligomerizazioa beharrezkoa den ala ez poroak eratzeko.

#### 1.1.6.3 BCL2 familiako kideen funtzio ez-apoptotikoak

BCL2 familiako proteinek apoptosis erregulatzeko duten aktibitate biokimiko nagusia MOMParen modulazioa da. Hala ere, azkenengo urteetan BCL2 proteinen funtsezkoak diren funtzio ez-apoptotikoak ere badituztela argi geratu da.

- BCL2 familiako proteinak garapenean

Programatutako heriotz zelularra garapenean zehar ematen den prozesu garrantzitsua da eta kasu gehienetan heriotz hau apoptosi bidezkoa da. Behatzen indibidualizazioa ornodunetako programatutako heriotz zelularren modelu zaharrena da eta apoptosiak organoak zelan lantzen dituen azaltzeko erabiltzen den adibide morfogenetiko klasikoa da (Montero *et al.*, 2010). BAX eta BAK, BCL2 familiako efektoreak, falta dituzten saguek enbrioi izanda hiltzen dira normalean, baina bizirauten duten saguek oin palmatuak izaten dituzte (Lindsten *et al.*, 2000). BID, BIM eta PUMA BH3-domeinu bakarreko proteinak faltan dituzten saguetan antzeko fenotipoa behatzen da (Ren *et al.*, 2010).

Behatzen moldaketan duen inplikazioaz gain, prozesu apoptotikoak garapenean zeharreko beste une garrantzitsuetan ere hartzen du parte, ugaztunen bularren hodian formazioan, hestearen moldaketan, bihotz morfogenesisian, eta nerbio sistemaren garapenean zeharreko zelula supernumerarioen deuseztatzean besteak beste.

- BCL2 familiako proteinak minbizian

Apoptosian ematen diren akatsak tumoregenesi eta botikarekiko erresistentziaren atzean daude eta akats hauengatik batzuetan kimioterapiak kale egiten du. Orain arte, apoptosiaren blokeoa batez ere BCL2-motatako proteinen gainadierazpenagatik ematen da (Hanahan & Weinberg, 2011).

Kasu askotan, minbizi zelulak heriotzerako "prest" eta gainadierazita dauden proteina antiapoptotikoen "menpe" daude (Certo *et al.*, 2006). Proteina antiapoptotiko eta BH3-domeinu bakarreko proteinen arteko interakzioa zuzenean inhibitzea "menpekotasun" hau duten zelulak selektiboki hiltzeko etorkizun handiko estrategia da, izan ere zelula hauek beste zelulak baino erraztasun handiagoz barneratuko baitira bidezidor mitokondrialean. BH3-profilaketa izeneko teknika hasi da erabiltzen zelulen heriotzaren blokeoaren arduradunak diren proteina antiapoptotikoak zehazteko. Teknika honetan, minbizi zeluletako mitokondria isolatuak BH3-domeinu bakarreko proteinen BH3 domeinutik eratorritako peptidoetara ikusgai jartzen dira eta cyt c askapena neurtzen da peptidoak eragindako lekualdaketa egon den edo ez aztertzeko.

BH3-profilaketa kontzeptua zabalduz, gaixoak BH3 peptidoak imitatzen dituzten botikekin tratatzean etorkizun oparoko estrategia bilakatu da. Botika horietako bat ABT-737 inhibitzaile kimikoa (edo bere forma orala den ABT-263) da, Abbot Laboratories-ek garatu zuena BCL2 inhibitzaileak identifikatzeko NMRan oinarritutako screeninga erabiz. ABT-737 afinitate subnanomolarrekin batzen da BCLXL, BCL2 eta BCL-W proteinen poltsiko hirofobikora, baina MCL-1 eta A1 proteinetara ez da batzen. ABT-737/ABT-263 BCL-2 eta BCL-XL maila altuak eta MCL-1 maila baxuak dituzten zelula tumoralak azkar hiltzen dituzte apoptosi bidezidor mitokondrialaren bidez, eta ez dute heriotzik eragiten zelula normal gehienetan zenbait linfzito eta plaketa kenduta.

BCL2tan oinarritutako minbiziaren aurkako terapiak garatzeko planteamendu erakargarria BH3-mimetikoak diren peptidoak euren  $\alpha$ -helize konformazioa handituz euren ituetarako batuketa areagotzea da.

Proteina antiapoptotikoen kontrara, zeintzuk normalean onkogene bezala funtzionatzen duten, BCL2 familiako proteina proapoptotikoak tumore supresoretzat hartzen dira eta ondorioz, euren ablazio genetikoak tumoregenesi dakar c-MYC bezalako onkogeneak adierazita daudenean. Honekin jarraituz, BAX/BAK proteinen aktibatzaile zuzenak diren BH3-domeinu bakarreko proteinak imitatzen dituzten SAHB peptidoak, BID SAHB peptidoa bezala, etorkizun oparoa duen beste estrategia bat da dagoeneko garatzen ari dena (Gavathiotis *et al.*, 2012). Estrategia alternatibo bat da BAX-motatako proteinen poroa eratzen duten guneen peptidoak erabiltzea, BAX- $\alpha$ 5 besteak beste (Garcia Valero *et al.*, 2011).

- BCL2 proteinak dinamika mitokondrialean

Ziurrenik BCL2 familiako proteinen funtzio ez apoptotiko interesgarri eta konplexuena dinamika mitokondrialarekin erlazionatutakoa izan daiteke (Martinou & Youle, 2011). BCL2 familiako proteinen eta dinamika mitokondrialaren arteko lehen lotura hurrengo behaketen ondorioz sortu zen: 1) Apoptosian zehar mitokondrioek fragmentazioa pairatzen dute (Arnoult, 2007; Martinou & Youle, 2006), eta 2) DRP1 apoptosiko bidezidor mitokondriala eta BAX bidezko MOMP suspertzen ditu (Frank *et al.*, 2001). Beranduago apoptosian zehar BAX eta BAK DRP1 eta MFN2 proteinekin ko-lokalizatzen dutela ikusi zen, fisio mitokondrial guneetan (Karbowski *et al.*, 2002). BAX eta BAKen fisio guneetarako translokazioa DRP1enarekin batera fisio makinariak apoptosia eragiteko funtsezkoa dela iradokitu zen (Youle & Karbowski, 2005). Horretaz gain, BAX/BAK en menpeko DRP1en mintzarekiko asoziazio egonkorra deskribatu zen, DRP1en sumo kongujazioarekin erlazionatutakoa (McBride *et al.*, 2006). Gainera, DRP1ek apoptosian parte hartzen du BAKen oligomerizazioa estimulatuz eta ondorioz MOMP areagotuz (Montessuit *et al.*, 2010).

Berriki, BCL2 familiako proteina proapoptotikoek bi gertaera mitokondrial banandu eragiten dituztela proposatu izan zen, gangar loturen zabalera MIMean eta MOMP. BH3-domeinu bakarreko proteinek OPA1en askapena eragiten dute mitokondriatik, eta ondorioz OPA1 konplexuen desmuntaia eta cyt c askapena emango da. BH3-domeinu bakarreko proteinetaz gain, BAX eta BAK proteinek MOMEan kokatutako proteinekin interakzionatu dezaketela iradokitu da OPA1 konplexuen desmuntaia eraginez BH3-domeinu bakarreko proteinen presentziaren menpeko mekanismo bidez, baina BAX/BAK oligomerizazio eta MOMP ez menpeko bidez (Yamaguchi *et al.*, 2008). Horretaz gain, OPA1 konplexuen desmuntaia cyt c gehienak kanpo mintzeko barne muga zeharkatu ahal izateko kritikoa da, mitokondrioan dagoen cyt c gehiena gangar barruan itxita dagoelako OPA1 konplexuen bitartez. Oligomerizatutako BAX eta BAK kanpo eta barne mintzen kontaktu guneekin elkarreagiten dutela proposatu da, ondorioz kanpo mintzeko iragazkortasunean eragina izango dute eta MIMeko proteasa den OMA1 proteinaren aktibazioa eraginez. Elkarreagin hauek OMA1 proteasaren aktibitatea areagotzen dute, ondorioz L-OPA1 autodegradazioa bizkortuz, OPA1 konplexuen desmuntaia eta ondorioz cyt c askapena eraginez (Jiang *et al.*, 2014).

Nekroptosian zehar BAX MFN2rekin elkarreagiten duela behatu da, mPTPren atalasea jeitsiz (Whelan *et al.*, 2012). Aitzitik, apoptosian zehar BAK MFN1ekin elkarreagiten du MOMP eraginez (Brooks *et al.*, 2007). Gainera, DRP1 eta BIF1 proteinek BAX oligomerizazioa eta BAKek eragindako mintz iragazkortzea eragiten dute hurrenez hurren, mintz kurbaturan eragindako aldaketen eraginez eta fisio mitokondrial normalean zehar izaten dituzten aktibitate desberdinak izanik (Ettxebarria *et al.*, 2009; Montessuit *et al.*, 2010).

Bestalde, BAX eta BAK proteinek zelula osasuntsuetan dinamika mitokondrialak modulatzeko dituzte. Esparru horretan, BAX/BAK DKO zelulek fragmentatutako mitokondrioak izaten dituzte BAX/BAK fusio mitokondrial normalean paper bat betetzen dutela iradokituz (Karbowski *et al.*, 2006). BAX funtzio hau MFN2rekin elkarrengaitan betetzen duela behatu da (Hoppins *et al.*, 2011). BAXek dinamika mitokondrial mintz birmoldaketan parte hartzen duen BIF1 proteinarekin elkarrengaitan ere erregula dezake, bai baldintza osasuntsu zein apoptotikoetan (Cuddeback *et al.*, 2001; Etxebarria *et al.*, 2009). BAK mintz birmoldatze prozesuetan parte hartzen duela iradokitu da bai mitokondrioan baita ERan ere. Gainera, BCL-XL proteinek dinamika mitokondrial normala eraldatu dezake bi prozesuak sustatuz, bai fusio mitokondrial (Delivani *et al.*, 2006) baita fisio mitokondrial ere (Beranek *et al.*, 2009). BCL-XL eta DRP1 arteko elkarrengaitan fisiko bat ere deskribatu da. Interakzio honek DRP1en GTPasa aktibitatea areagotzen du *in vitro*, mitokondrioak banatzeko duen joeran eragina izan dezakeena (Li *et al.*, 2008). BCL-W proteina ere fisio mitokondrial tasa normalak mantentzeko beharrezkoa izan liteke (Liu & Shio, 2008).

- BCL2 proteinen funtzioak MIM, ER eta Golgi aparatuan

Gaur egunerarte, BCL2 proteinek MOMEan duten funtzionatzeko moduan ipini izan da atentzioa. Hala ere, agerian geratzen hasi da beste mintz intrazelular batzuk ere prozesu garrantzitsu askoren gune direla eta heriotz zelularra eta biziraupen zelularra zehaztu dezaketela zeintzuetan BCL2 famliako proteinek tartean dauden.

MIMari dagokionez, duela gutxi ikerketek BCL-XL eta MCL-1 proteinek metabolismo zelularra erregulatzeko MIMean kokatu daitezkeela ezagutzera eman dute. ERari dagokionez, BCL2 proteinek organulan bertan gertatzen diren prozesu garrantzitsuak modulatzeko dituztela aspalditik da jakina, prozesu hauek kaltzio homeostasia, autofagia, eztolestutako proteinen erantzuna eta ER morfogenesisia biltzen dituzte (Heath-Engel *et al.*, 2008; Szegezdi *et al.*, 2006). Seguraski BCL2 proteinek ERan duten funtzio guztietatik ikertuena kaltzio homeostasian duten erregulazio funtzioa da. Zenbait BH3-domeinu bakarreko proteinek kaltzio intrazelularrean handipen bat eragiten dute ERan kokatutako BCL2 famliako kide batzuekin elkarrengaitan, BAK proteinarekin adibidez (Klee *et al.*, 2009). BCL2 proteinek inositol 1,4,5-trifosfato hartzailarekin (IP<sub>3</sub>R) interakzionatzen duela behatu da, modu horretan IP<sub>3</sub>R bitartekotza egiten duen Ca<sup>+2</sup> irteera, zeina zitosoleko entzima desberdin asko erregulatu dituen, inhibituz (Rong *et al.*, 2009). Duela gutxi BOK IP<sub>3</sub>R hartzailarekin konstituboki lotuta dagoela aurkitu da, baina BCL2 proteinek egiten duen kanalaren Ca<sup>+2</sup>-aren mobilizazioa erregulatu ordez, BOK proteinek IP<sub>3</sub>R hartzailak proteolizatzetik babesten ditu (Schulman *et al.*, 2013). Gainera, BOK proteinarekin gainadierazpenak aldaketa morfologikoak eragin ditzakeela ere iradokitu da, bai ERan eta baita Golgi aparatuan ere, apoptosian zehar BOKek organulu hauetan funtzioen bat bete dezakeela

adierazi lezakeena (Echeverry *et al.*, 2013). BOKen kasuan bezala, BAXen kopuru bat Golgi aparatuan konstitutiboki kokatzen da zelula ama enbrionikoetan, non egoera preaktiboan mantentzen den mitokondriara translokatzeko denerarte p53rekiko dependentea den modu baten (Dumitru *et al.*, 2012).

#### 1.1.6.4 BOK

Argi dago BOK proteinaren akzio mekanismoari buruzko ezagumendua BAX eta BAK proteinenarekin konparatuz askoz murriztuagoa dela. Jarraian BOK proteinaren inguruko informazioaren deskribapen laburra azaltzen da, batez ere eztabaida sortzen dituzten zenbait gai polemikotan fokaturik.

BOK (ingelesez, *BCL2-related ovarian killer*) genea 1997an isolatu zen lehenengoz arratoi obario cDNA liburutegi batetik (Hsu *et al.*, 1997). Ikerketa horretan hurrengo behatu zen, (i) BOK proteinak zenbait BCL2 homologia domeinu dituela, (ii) BOK proteinak apoptosia eragiten duela, eta (iii) BOK proteinak MCL-1 proteinarekin era tinko batean interakzionatzen duela. Beraz, kriterio horietan oinarrituz, BOK BAX-motatako BCL2 familiako proteina proapoptotiko bezala definitu zen (Hsu *et al.*, 1997). Lehen argitalpen honetan BOKen adierazpena zenbait ugalketa ehunetara mugatuta dagoela proposatu zen, obario, testikulu eta umetokira, besteak beste. Ondorengoko beste argitalpen batek ehun horietan ematen den BOK proteinaren adierazpena baieztatu zuen, baina beste ehun batzuetan ere antzeman zen adierazpena, kolonean, urdailean, karenan eta arean (Gao *et al.*, 2005a). Duela gutxi, BOK mRNA adierazpena aztertu zen umetoki eta obarioetan oso ugaria dela behatu delarik, burmuin, bare, birika, urdaila, heste mehar eta giltzurrunean ere maila altuan agertzen da eta maila baxuagoan baina oraindik detektagarrian gibel, timo, nodulu linfatiko, bihotz eta hezur muinean (Ke *et al.*, 2012).

Ehunen espezifizitatearen inguruko eztabaidaz gain, bere lokalizazio intrazelularri buruzko zalantza asko ere badaude. Hasiera batean BOK funtsean proteina zitosolikoa zela proposatu zen, frakzio txikia mitokondriarekin kolokalizatzen zuelarik (Brown *et al.*, 2004). Beste ikerketa batean BOK mitokondrian kokatzen zela behatu zen (Yakovlev *et al.*, 2004). Geroago, apoptosia induzitu ostean BOK mitokondriara masiboki migratzen duela proposatu zen, MOMean txertatua izango delarik (Gao *et al.*, 2005). Lokalizazio zitosolikoa eta mitokondrialia izateaz gain, nukleoan ere kokatu daitekeela proposatu zen (Ray *et al.*, 2010). Berriki, mitokondrian kokatzeaz gain, gainadierazitako BOK ER eta Golgi aparatuko mintzekin asoziatuta dagoela ere aurkitu da (Echeverry *et al.*, 2013). BOK proteinak ERan duen funtzioa oraindik argitu gabe dago. Alde batetik, BOKen gainadierazpenak ER eta Golgiren morfologia aldatzen duela ikusita BOK proteinak organulu hauen apoptosian zeharreko desmuntaiaren paperen bat izan lezakeela iradokitzen du. Baina beste ebidentzia batzuek BOK IP<sub>3</sub>R hartzailerekin konstitutiboki lotuta dagoela adierazten dute (Schulman *et al.*, 2013). Horren arabera, BOKen hartzaille honekiko

batuketak IP<sub>3</sub>R hartzailak apoptosian zehar ematen den proteolisitik babes lezake (Schulman *et al.*, 2013).

Azkenik, nahiz eta ebidentzia gehienek BOK BAX-motatako proteina proapoptotikoa dela iradokitzen duten, ez dago guztiz argi BOKek apoptosia BAX/BAK proteinek egiten duten bezala eragiten duen edo ez. Lehenik eta behin, zenbait ebidentzia desberdinek adierazten dute BAX/BAKek ez bezala, konstitutiboki adierazitako BOK proteinak ez duela nahitanahiez H122 zeluletan apoptosia eragiten (Rodriguez *et al.*, 2006), ezta BAX/BAK DKO fibroblastoetan ere (Dewson & Kluck, 2009; Echeverry *et al.*, 2013). Bigarrenik, BAX/BAK en kasuan ez bezala, BOK proteinak aktibitate proapoptotiko osoa lortzeko bere C-terminaleko gune hidrofobikoaren beharra ez duela ematen du (Brown *et al.*, 2004; Echeverry *et al.*, 2013; Hsu & Hsueh, 1998). Izan ere, berriki argitaratu den ikerketa batek adierazten du BOK BAX eta BAK proteinekin BH domeinuetako sekuentzia antzekotasun txikia duela (Aouacheria *et al.*, 2013). Hirugarrenik, BOK<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> eta BOK<sup>-/-</sup>BAX<sup>-/-</sup> sagu *knockout* bikotzak ez dute anormaltasun nabaririk erakusten, BAX edo BAK en galera hutsarekin behatzen diren anormaltasunak kenduta. Hau BAX/BAK DKO saguekin ikusten den heriotz tasa altua eta garapen anormaltasun garrantzitsuekin alderatuta erabat desberdina da (Ke *et al.*, 2013). Eta azkenik, BOK giza minbizietan delezionatuta aurkitzen diren geneetatik errepikatzen den geneetako bat da, BOK supresore tumoral bezala joka lezakeela iradokituz (Beroukhim *et al.*, 2010).

## 1.2 HELBURUAK

DRP1 eta BCL2 familiako proteinak mitokondrioko kanpo mintzean kokatzen dira zelula funtzio normal eta apoptosis erregulatzeko. Hala ere, nahiz eta ikerketa sakonak egin diren, proteina hauek maila molekularrean nola funtzionatzen duten ez da guztiz ezagutzen. Tesi honen helburu orokorra beraz, DRP1 eta BCL2 familiako kide ezezaguna den BOK proteinen mekanismo molekularren ezagumenduan aurrerapausuak ematea da, bereziki mintzaren testuinguruan. Horretarako, disziplina anitzeko planteamendua egin dugu, teknika biofisiko, biokimiko eta biologia molekularreko teknikak bai sistema azelular zein sistema zelularretan uztartuz.

### Helburu zehatzak

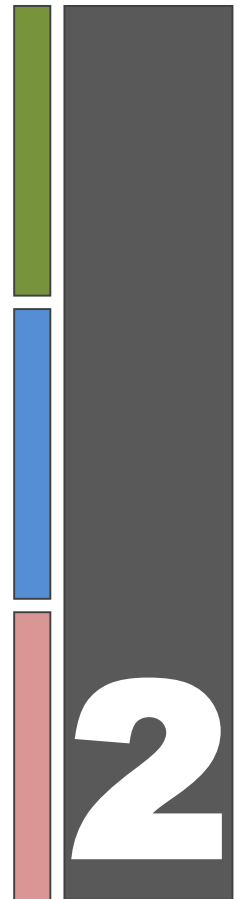
1. DRP1:CL elkarrekintza prozesuaren oinarri molekularrak eta ondorio funtzionalak argitzea, berreraikitako *in vitro* sistemak erabiliz.
2. BOK proteina birkonbinatua lortu eta karakterizatzea eta proteina honen oinarriko ezaugarri fisiologikoak berreraikitzea, lipido konposaketa zehatza duten mintz-eredu sistemak erabiliz.
3. Arestian aipatutako berreraikitako *in vitro* sistemak erabiltzea, BOK proteinen aktibazio funtzionala emateko beharrezkoak diren mekanismo molekularrak argitzeko.
4. BOK proteinak ingurune zelularrean duen lokalizazio eta funtzioaren inguruko ezagumendu zehatzagoa lortzea.



**2 KAPITULUA:**

**TEKNIKA**

**ESPERIMENTALAK**





## 2. TEKNIKA ESPERIMENTALAK

Aurkezten den tesia burutzeko erabilitako teknika esperimentalen bilduma jasotzen da atal honetan. Halere, teknika hauen helburu zehatzetarako erabilpena dagokion Eraitzen kapituluak laburki eztabaidatuta agertuko da.

### 2.1 BERRERAIKITAKO EREDU SISTEMAK

BCL2 familiako proteinek zelularen bere honetan ematen dituzten elkarrekintzak maila molekularrean azaldu ahal izateko erronka nagusietako bat, MOMP prozesua bideratzen duten interakzio inter- eta intra-molekularren sarearen konplexutasun maila da. Gainera, interakzio hauek bi ingurune desberdinetan gerta daitezke: zitosolean edo mintzean, DRP1en kasuan ere gertatzen den bezala. Zelula mailan, proteinen ekintza-mekanismoaren inguruko informazioa lortzeko dituen zailtasunak kontuan hartuta, tesi lan honetan konposaketa definitu eta sinplifikatu bateko berreraikitako *in vitro* sistemak erabili ditugu. Sistema hauen osagaiak lipido puruz eratutako mintz-ereduak eta araztutako proteina edo peptidoak dira. Hortaz, erabilitako sistema erredukzionistak proteina eta lipidoen arteko elkarrekintzak aztertzea baimentzen digu, alde batetik, mintz biologikoen konplexutasuna alde batera utzi dezakegulako eta bestetik, mintzaren ezaugarriak eta lipido konposaketan aldaketak era kontrolatuan egitea ahalbidetzen digulako.

#### 2.1.1 OSAGAI LIPIDIKOAK

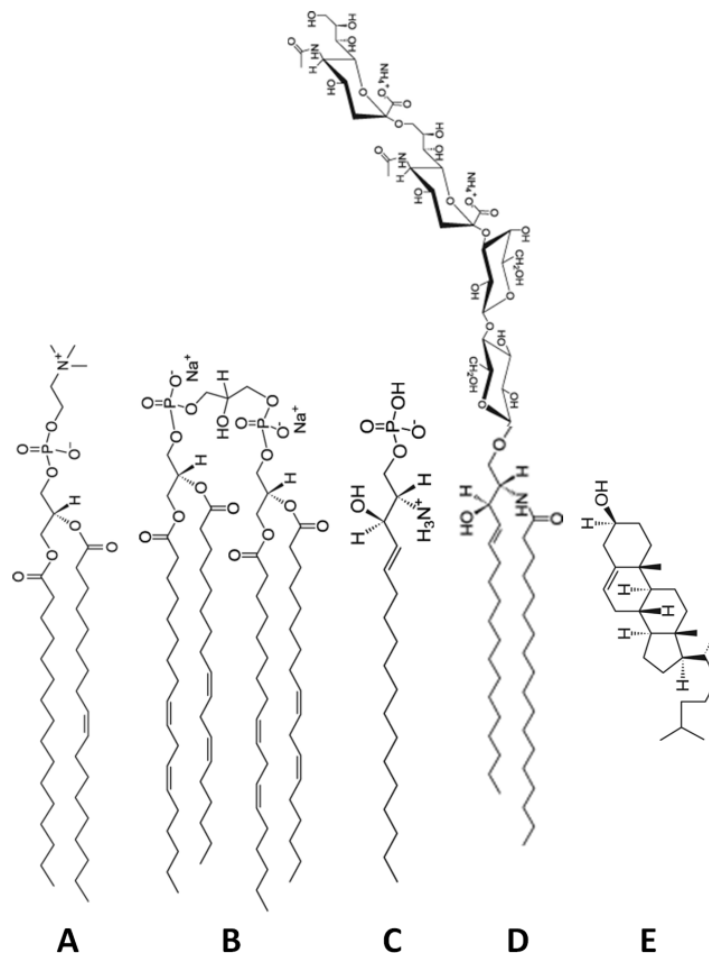
Mintz biologikoak zelula baten inguruan, ingurune kimiko eta biokimiko ezberdinak zehaztuz antolatzen diren hesitutako lipido geruza bikoitzak dira. Muga fisiko baten funtzioa izateaz gain, biomintzek beste berebiziko prozesuetan ere hartu dezakete parte, adibidez, seinale zelular ezberdinen harreran eta transdukzioan, fosforilazio oxidatiboan eta endo- edo exozitosian.

##### 2.1.1.1 Lipidoak: sailkapena eta ezaugarriak

###### 2.1.1.1.1 Lipido motak

Lipidoak aldakortasun handiko molekula anfipatikoak dira, buru polar bat eta zatiki hidrofobiko batez (normalean kate azilikoak) osatuak. Ezaugarri hau dela eta, energetikoki mesedegarria den besikula izeneko egitura konplexuetan berrantolatze gaitasuna daukate lipido batzuek.

Mintzean dauden lipidoak sailkatzeko talde nagusienak fosfolizeridoak, esfingolipidoak, glikolipidoak eta esterolak dira (2.1 Irudia).



**2.1 Irudia. Lipido mota ezberdinen egituren eskema.** Kimikoki mota ezberdin gehien dituzten biomolekulak dira; buru polar desberdinez gain, kate azilikoan luzera eta asetasunek aukerak biderkatzen dituzte. Fosfoglicerolipidoen ordezkari gisa PC **A**) eta CL **B**) daude. Esfingolipidoen artean, esfingosina-1-fosfato **C**) eta GD3 gliko esfingolipidoa **D**) daude. Azkenik, kolesterola **E**) egitura azaltzen da.

### Fosfoglicerolipidoak

Fosfoglicerolipidoak edo fosfogliceridoak biomintzetan agertzen diren lipido ugariak dira. Lipido hauen egituraren euskarria glizerol molekula bat da, zeinari ester lotura baten bidez fosfato talde bat eta kate aziliko bat ala bi batu diezaioketen. Honez gain, fosfato taldea molekula ezberdinekin egokitu daiteke. Buru polarraren aldagarritasunean oinarrituz, fosfoglicerolipido ezberdinak aurkitu daitezke: fosfatidilkolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositola (PI), fosfatidilglizerola (PG), fosfatidilserina (PS) eta azido fosfatidikoa (PA). Honekin batera, buru polarrera atxikitutako taldearen izaeraren arabera, pH fisiologikoan, lipidoak anionikoak (PI, PG, PS eta PA) edo zwiterionikoak (PC eta PE) izan daitezke. Lan honetan, gehienbat kardiolipina (CL,) hiru glizerol molekulaz, lau kate aziliko eta bi fosfato taldez osaturiko fosfolipido anionikoa aztertu da.

### Esfingolipidoak

Esfingolipidoek esfingosina (kate luzeko amino alkohola) daukate glizerola beharrean euskarri moduan. Talde honetan, beste batzuen artean honako lipidoak aurki daitezke: esfingosina, esfingosina-1-fosfato, zeramida eta esfingomielina.

### Glikolipidoak

Lipidoen buru polarrak ere hainbat azukreekin lotuta egon daitezke, glikolipido izena duen taldea osatuz. Lipidoaren egituraren arabera, bi talde nagusi daude: glikoglizerolipidoak (glizerolipido egitura) eta glikoesfingolipidoak (esfingolipido egitura). Lipido mota hauek mintz plasmaticoaren kanpo mintzean kokatu ohi dira.

### Esterolak

Kolesterola, animalia mintzetan ugaria den lipidoa da eta mintzaren iragazkortasuna eta jariakortasuna aldatzeko ahalmena dauka. Esterolek aurretik deskribatutako beste lipidoekin konparatuz egitura guztiz desberdina daukate. Egituraren zati nagusia hidrofobikoa da, eraztun esteroide eta kate aziliko txiki batez osatua; parte hidrofilikoa, berriz, hidroxilo talde bat da.

#### **2.1.1.1.2 Lipidoen polimorfismoa**

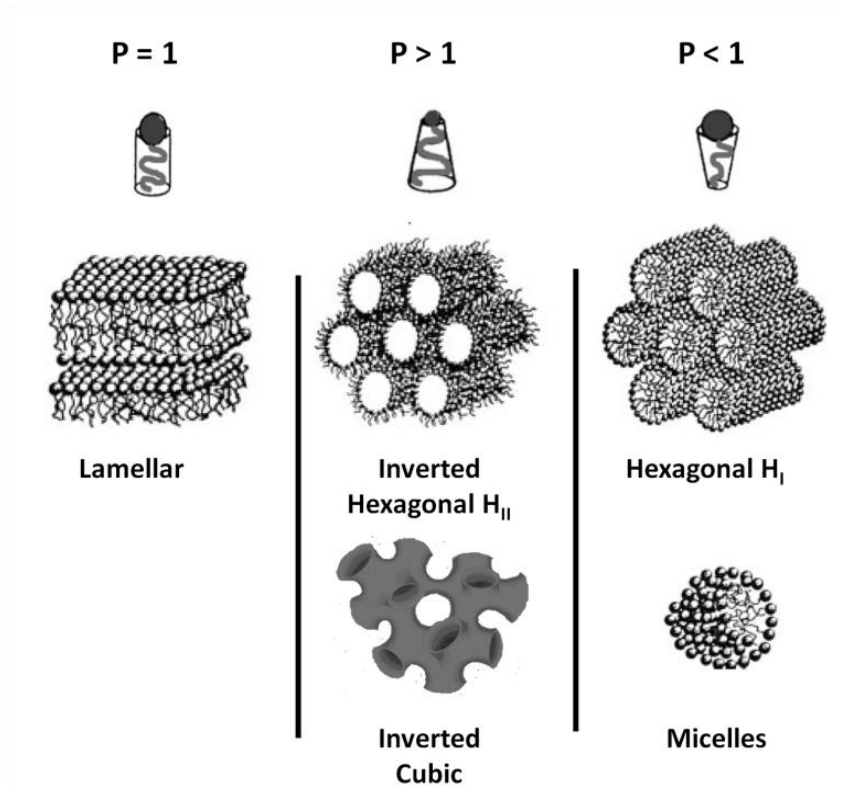
Lipidoen polimorfismoa molekularen itxura eraginkorrean oinarritzen da, azken hau lipido baten buru polar eta isats hidrofobikoaren arteko bateragarritasunaren menpekkoa delarik. Ondorioz, lipidoen polimorfismoa morfologia ezberdineko lipidoen egituraren aniztasunari deritzogu. Beraz, lipidoaren paketatze parametroa ( $P$ ) honela definitu daiteke:

$$P = \frac{V}{A \cdot l}$$

non,  $V$  lipido osoaren bolumena den,  $A$  lipido-ur interfasean buru polarrak betetzen duen azalera eta  $l$  lipidoaren luzera.

Zilindro itxuradun lipido baten ( $P=1$ ) kasuak, buru polarraren eta kate azilikoaren zeharkako ebakien azalerek antzeko balioak dituzten egitura bat deskribatuko luke: lipido mota hauek lipido geruza bikoitz egonkorak eratzearen aldekoak izango dira. Haatik, azalera desberdinak direnean, bi ez-zilindro itxurako talde aurkitu daitezke: positiboki-kurbatutako ( $P>1$ ) lipido ez lamelarrak eta negatiboki- ( $P<1$ ) kurbatutakoak (2.2 irudia). Bi monogeruzen artean, berezko kurbadura ezberdina baldin bada lipido geruza bikoitza asimetrikoki estresatua egongo da eta egitura ez-lamelarrak eratu ahalko dira. Honenbestez, kurbadura intrintsekoa duten lipido hauek monogeruzetan berezko kurbadura bat eragin dezakete: positiboki-kurbatutako lipidoek mizelak eta fase hexagonal arruntak ( $H_1$ ) era ditzakete, kurbadura positibodun mintzak ere

deitutakoak; negatiboki-kurbatutako lipidoek, berriz, alderantzikatutako fase hexagonalak ( $H_{II}$ ) edo fase kubikoak era ditzakete, kurbadura negatibodun mintz bezala ere ezagututakoak. (Cullis & De Kruijff, 1979; Helfrich, 1973; Marsh, 1996) (2.2 Irudia). Fase hexagonal edota kubikoak topologikoki konplexuak eta kurbadura handiko egiturak dira, ondorioz, zeluletako puntu zehatzetan bakarrik ager daitezke, hauen artean, fusio eta fisio guneetan, mintzean txertaturiko proteinen inguruan edota mintzean agertu daitezkeen akatsetan (e.b. poroak)(Mouritsen, 2011).



**2.2 Irudia. Lipidoen polimorfismoa: lipidoen geometria eta eratu ditzaketen mintz egiturak.** Zilindro itxurako lipidoek ( $P=1$ ) egitura lamelarrak faboratzen dituzte; negatiboki kurbatutako lipidoek, berriz, alderantzikatutako fase hexagonalak ( $H_{II}$ ) eta fase kubikoak eratzen dituzte. Azkenik, positiboki kurbatutako ( $P<1$ ) lipidoek mizelak eta egitura hexagonalak ( $H_I$ ) sortzen dituzte. (Mouritsen, 2011)-tik moldatua.

Lipido baten morfologiaren jokaera bere egitura kimiko zehatzean oinarritzen da, baita tenperatua, ur kantitatea, pH-a, gatzen kontzentrazioa eta katioi dibalenteen presentzia bezalako ingurunearen ezaugarrien menpekotasunean ere (Cullis & De Kruijff, 1979).

### 2.1.1.2 Mintz-ereduen sistemak

Azken hamarkadetan zehar, lipido eta lipido-proteina nahasketen propietateak aztertzeko mintz-eredu sistema ugari diseinatu dira. Sistema hauek metodoaren eta konplexutasunaren

arabera prestatzeko, honako taldeak eraiki daitezke: (a) Lipido monogeruzak, (b) Mizelak eta (c) Lipido-besikulak (liposomak).

#### **2.1.1.2.1 Liposomak: Sailkapena eta ezaugarriak**

Liposomak, lipido geruza bikoitz batez edo gehiagoz osaturiko besikula artifizialak dira (Patel, 1990). Liposomen barnealdeak, prestatuta izan direneko soluzioaren bolumen bat gordetzen du (Gennis, 1989; Patel, 1990). Mintz-eredu sistema gisa, liposomen abantailarik nagusia mintzekin elkarrekintzak dituzten proteinen egitura-funtzio loturaren azterketarako beharrezkoak diren kurbadura, lipido konposaketa, mintzaren jariakortasuna, karga dentsitatea eta iragazkortasuna bezalako parametroen aldaketak era erraz baten modula daitezkeela da.

Liposomen osagai kimikoek mintzaren jariakortasuna, karga eta iragazkortasuna ezartzen dituzten ezaugarriez gain, liposomak bai tamainan, bai forman, eta baita lamela kopuruan ere ezberdinak izan daitezke. Tamaina eta itxura kontuan hartuz, honako taldeak aurkituko dira (2.3 Irudia):

- **Lamela anitzeko besikula handiak** (MLV, ingelesezik *Multilamellar Large Vesicles*): Lamela ugari eta tamaina ezberdineko besikulak dira, 100-1000 nm tartekoak eta zentrokideak diren 7-10 lamela edo lipido geruza bikoitzez osatuta daude. Beraz, tamaina zehatza eta bigeruza bakarria beharrezkoa ez den saioetarako erabilgarriak dira. Aurretik lehortutako lipidoek osatutako lipido-film zuzenean uretako soluzio batean berresekiz prestatzen dira. Bere homogeneitatea handitu daiteke eta bere tamaina murriztu izozte-desizozte zikloak eginez.

Tesi lan honetan lamela anitzeko besikulak prestatzeko erabili den protokolo zehatza jarraian azaltzen da, 1.Protokoloan.

#### **1. Protokoloa** *MLVen prestaketa*

1. Lipido stockaren prestaketa: Lipido stock puruak kloroformo/metanol (2:1 v/v) soluzioan disolbatzen dira. Beharrezkoa den lipido kantitate zehatza soluzio organikoan dagoen stocketik kristalezko hodi batera pipeteatzen da.

(protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

2. Disolbatzaile organikoaren lurrunketa: MLVak prestatzeko lehenengo eta behin lipidoak disolbatuta dauden fase organikoa lurruntzen uzten da nitrogeno gas korrante batekin. Saio-hodiaren beheko aldean lipido-film bat eratzen denean, saio-hodia 1-2 orduz huts ponpa bati konektaturik dagoen lehorgailu batean uzten da. Azkenengo pausu hau disolbatzaile organikoaren arrastorik ez geratzeko ematen da.
3. MLV-en sorkuntza: Ondoren, lipido filma indargetzaile arruntean (edo zundak enkapsulatu behar direnean, dagokion indargetzailean) berresekiko da trantsizio tenperaturarik ( $T_m$ ) altuena daukan lipidoaren  $T_m$ -a baino  $5^\circ\text{C}$  gehiagora. Nahasketa bortex batean bost minutuz irabiatzen da, lipido-filma saio-hodiko paretetatik askatu arte. Lortzen den esekidura, zuria eta homogeneoa izan behar du. Esekidura hau, MLV-z osaturik egongo da.

▪ **Lamela bakarreko besikula txikiak** (SUV, ingelesetik *Small Unilamellar Vesicles*): Lamela bakarreko besikula txikienetarikoak dira. Tamainaren muga inguruko indar ionikoaren eraginez edo mintzaren lipido-osaketaren eraginez aldatu daitezke. Normalean 10-50 nm-tako diametroa daukate. Era erraz batean prestatu daitezke MLVak sonikatuz (Tenchov *et al.*, 1985). Duten diametro txikia dela eta, kurbadura estres handia dute, ondorioz kanpo mintzak lipido aberasketa du barne mintzarekin konparatuz. (Chapman, 1984; Szoka & Papahadjopoulos, 1980). Kurbadura estres honek, besikula hauek oso eredu egoki bihurtzen ditu mintz fusio/fisio prozesuak aztertzeko (Nieva *et al.*, 1989), izan ere *in vivo* estres egoera berdinen eraginpean egoten baitira. Bere tamaina txikiak espektroskopia optikorako oso erabilgarriak egiten ditu, argi dispersio artefaktuak gutxitzen dituelako.

▪ **Lamela bakarreko besikula handiak** (LUV, ingelesetik *Large Unilamellar Vesicles*): LUV-en tamaina 100-500 nm ingurukoa da. MLVetatik lortu daitezke izozketa-desizozketa ziklo desberdinen ostean, nahi den poro diametroa duen polikarbonatozko mintz batetik pasaraziz (Mayer *et al.*, 1986; Mui *et al.*, 2003). Besikula hauen egonkortasun eta homogeneitatea dela eta, azterketa funtzional gehienak burutzeko mintz eredu egokiena da. Hala ere, tamaina submikroskopikoa dute. Jarraian LUVak prestatzeko protokolo zehatza (2.Protokoloa).



## **2. Protokoloa** LUVen prestaketa

1. MLVen prestaketa: 1.Protokoloa ikusi.
2. FT-MLV prestaketa: MLVei 10 izozte/desizozte ziklo egiten zaizkie, prozesu honetan bigeruzaz zentrukideak murrizten doaz, ondorioz besikulek tamaina txikiagoa hartzen dute.
3. Estrusio prozedura: Behin FT-MLVak ditugunean, lamela bakarra eta tamaina zehatza duten besikulak lortzeko, besikulak estruitzen ditugu (Hope *et al.*, 1985)-an deskribatutako metodoak esaten duen bezala. Lagina 10 aldiz pasarazten da egokia den poro diametroa duten polikarbonatozko filtroetatik (Nucleopore, San Diego, CA, USA), 200 psi-ko nitrogeno fluxuaz baliatuz.

▪ **Lamela bakarreko besikula erraldoiak** (GUV, ingelesetik *Giant Unilamellar Vesicles*): Lipido osaketaren arabera tamaina ezberdina izan dezakete, 25  $\mu\text{m}$ -tik 100  $\mu\text{m}$ -tara. GUVak gaur egun dauden mintz eredu sistemetatik etorkizun oparoena izan dezaketenak dira. Bere tamaina, “zelula batekin konparagarria”, zuzenean mikroskopioz ikustea ahalbidetzen du, prozesu dinamikoaren irudiak era zuzen batean lortzea baimenduz, besteak beste proteina-lipido elkarrekintzen zinetikak, lipido mikrodomeinuen eraketak, edo mintzaren aldaketa morfologikoak (Bacia *et al.*, 2011; Römer *et al.*, 2007; Saarikangas *et al.*, 2009; Sorre *et al.*, 2011). Lipido konposizio bera bi geruzetan duten besikula erraldoiak lipido-filma hidratatuz presta daitezke, lipido-fase trantsizio tenperatura gaintik denbora luzez (36 orduetik gora) “swelling” delako metodo espontaneo jarraituz (Reeves & Dowben, 1969), edo kanpo eremu baten presentzian elektroformazio metodoaren bitartez (Angeloval *et al.*, 1992; Luisi & Walde, 2000). Bigeruzaz asimetrikoak dituzten besikula erraldoiak prestatzeko teknika berriak garatu izan dira berriki, ur/olio emulsio alderantzizatu eta “microfluidic jetting” delakoak (Pautot *et al.*, 2003; Richmond *et al.*, 2011). Metodo guzti hauen artean, elektroformazio metodoa da erabiliena. Besikularen tamainaren, itxuraren eta lamela kopuruaren inguruko kontrol egokia baimentzen du eta hori da tesi honetan metodo zehatz hau erabili izanaren arrazoia. GUVen eraketarako jarraitu den protokolo zehatza jarraian azaltzen da (3.Protokoloa).

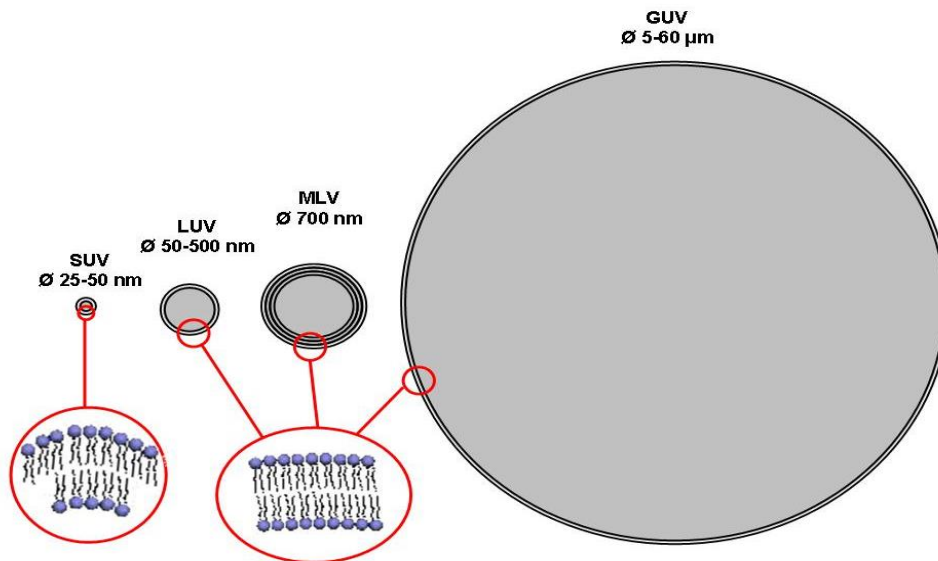
### **3. Protokoloa** *GUV prestaketa*

1- Lipido nahasturaren prestaketa: Lipido puru edo lipido nahastura stockak kloroformo/metanol (2:1 v/v) soluzio organikoan diluitzen dira, kontzentrazio finala 1 mM izango delarik. GUVak fluoreszentzia bidez mikroskopio konfokal baten bidez ikusi ahal izateko, %0.2 mol Rhodamine-PE (L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine-N-lissamine rhodamine B sulfonyl ammonio gatza, Avanti polar lipids) gehitzen zaio lipido nahasturari.

#### 2- Elektroformazioa:

- Lipidoa bi elektrodo dituen lau putzu dituen tefloizko ganberaren bi platino harietan hedatzen da. Guztira, lipido nahasketaren 6  $\mu$ l gaineratzen dira harien azalerara. Ondoren, ganbera huts ponpa batean sartu eta bi orduz mantentzen dira, horrela geratu litezkeen disolbatzaile apurrak lurruntzen dira.
- Bitartean, saioan erabiliko den indargetzailearen osmolaritate berdineko (200 mOsm kasu honetan) sakarosa soluzio bat prestatzen da.
- Behin lipidoak lehortuta, ganberaren putzu bakoitzari sakarosa soluzioaren 400 $\mu$ L gehitzen zaizkio eta elektroformakuntzan gerta litezkeen lurruntze prozesuak eragozteko, hau porta batekin estaltzen da. Lipido nahasturaren trantsizio tenperatura giro tenperatura baino altuagoa bada, ganbera eta sakarosa soluzioa aurretik berotu beharko lirateke.
- Platinozko hariak sorgailu baten elektrodoei konektatzen dira eta honako parametroak ezartzen dira: (1) ordu batez, 2.5V-oko tentsio eta 10Hz-etako maiztasuna duen sinus uhin bat; tarte honetan zehar, GUVak Pt-harira itsatsita elektroformatzen dira; ondoren, (2) maiztasuna 2Hz-etara jaitsi eta 30 min igaro behar dira, GUVak Pt-haritik askatzeko.

Garrantzitsua da aipatzea, normalean elektroformazio metodoa erabiliz besikula erraldoiak hobeto hazten direla gatz gutxiko tanpoietan. Hala ere, zenbait metodo garatu izan dira baldintza ioniko fisiologikoetan besikula erraldoiak sortu ahal izateko (Estes & Mayer, 2005; Montes *et al.*, 2010; Pott *et al.*, 2008).



**2.3 Irudia. Liposoma mota ezberdinen tamainaren konparaketa.** SUV: Lamela bakarreko besikula txikiak; LUV: Lamela bakarreko liposoma handiak; MLV: Lamela anitzeko besikula handiak; eta GUV: Lamela bakarreko besikula erraldoiak. Lipidoek lipido bigeruzak bikoitzean izango luketen orientazioa adierazteko bigeruzen eremu bat handitu da, non SUVen kurbadura handia eta gainontzeko besikulen mintz lauak adierazten diren.

#### 2.1.1.2.2 Monogeruza lipidikoak

Lipido monogeruza, lipidoaren anfi-patikusaren ondorioz, azalera urtsu baten gainazalean sakabanatzean erazten den egitura da. Fosfolipido molekulak azalera urtsuaren faseartean kokatzen dira, kate hidrofobikoak airerantz orientatuak eta buru polarrak ingurune urtsura begira kokatuta daudelarik. Mintz-eredu hauen prestakuntza eta karakterizazioan “Langmuir balantza” deiturikoan egiten da.

Langmuir balantza oso tresna garrantzitsua da peptidoek eta proteinek mintzekin ezarri ditzaketen elkarrekintzak aztertzeko. Beste mintz-eredu sistemekin alderatuz, lipido-monogeruzetan fase ez-lamelarrak, lipidoen gorabeherak edota mintzaren berezko kurbaduraren eraketak ekidinda daude; are gehiago, lipidoen paketamenduaren dentsitatea aukeratu daiteke. Tesi lan honetan, lipido monogeruzak proteina-lipido arteko elkarrekintzak aztertzeko xedearekin izan dira erabiliak.

Monogeruzen fisika: “Langmuir balantza” erabiliz egindako azterketak uraren azalera tentsioaren neurketetan oinarritzen dira, zintzilik dagoen zunda baten bidez egiten direlarik. Lehenik, zunda aire-likido interfasean arinki barneratzen da. Momentu honetan, zundak detektatzen dituen indarrak hurrengoak dira:

Indar totala = Zundaren pisua + zundaren flotagarritasuna+ azalera tentsioa

Neurketa egin baino lehen, zundak antzematen duen presioa zerora doitzen da, modu honetan pisu indarra baztertuz. Zundaren flotagarritasunak zundaren barneraketa dela eta lekualdatzen diren ur molekulek egiten duten indarra adierazten du, neurketak egiten diren bitartean zunda sakontasun konstante batean mantenduz deuseztatzen da. Ondorioz, indar totala (F) azalera tentsiora murriztu daiteke, hurrengo ekuazioak azaltzen duen moduan:

$$F = 2(w + t)(\gamma)(\cos \theta)$$

Non **w**, **t** = zundaren zabalera eta lodiera diren, hurrenez hurren,  **$\gamma$**  = azalera tentsioa eta  **$\theta$**  = kontaktu angelua.

Zunda disoluzio urtsuan sartzean, menisko bat sortzen da, ondorioz zero gradu dituen kontaktu angelua sortzen delarik. Modu honetan, ekuazioa horrela laburtu daiteke:

**$\gamma$**  = Indarra/Perimetroa/luzera,

hurrengo unitateetan ematen dena: dynes/cm = mN/m

Ur molekulek azalera tentsiorik altuenetakoa dute, dituzten erakarpen indar inter-molekular handiak direla eta, (72.8 mN/m 22°C eta 1 atmosferara) (Tanford, 1980). Aire-ur interfasean molekula anfipatikoen presentziak ur molekulen kohesio-energia oztopatzen du, uraren azalera tentsioa gutxituz. Gutxipen hau azalera presio ( **$\pi$** ) bezala ezagutzen da, unitate berdin baina kontrako zeinua duena:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

### 2.1.1.3 Mintz eredu sistemen karakterizazioa

#### 2.1.1.3.1 Lipido kuantifikazioa

Fosfolipido kontzentrazioa laginaren fosfato edukia neurtuz zehaztu da (Fiske & Subbarow, 1925). Laburbilduz, hurreratze hau fosfolipidoak hidrolizatzean datza, lipidoaren fosfato taldea aske geratuz eta zenbait erreakzioen ondoren produktu koloretsu baten ekoizpena ematen dena arte. Kontzentrazio ezaguneko fosforo soluzioak erabiltzen dira erreferentzia patroi bat lortzeko, non neurtutako laginaren absorbantzia tartekatzen den fosfolipido kontzentrazioa lortzeko. Protokoloaren deskribapen zehatzagoa jarraian (4.Protokoloa).

#### **4. Protokoloa Fosfolipidoen kontzentrazioaren neurketa**

- 1- Laginen prestakuntza: Kalibrazio kurba 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> stock soluzio batetik prestatzen da eta lipido lagina zenbait tututan pipeteatzen da 50 nmol fosforo inguru izan dezaten.
- 2- Liseriketa: Ondoren, 400 µl %70-ra dagoen azido perkloriko (HClO<sub>4</sub>) gehitzen zaio tutu bakoitzari eta 45 minutuz 205°C-ra inkubatzen da. Giro tenperatura izan arte hozten uzten zaio.
- 3- Saiakera kolorimetrikoa: 4 ml ammonio heptamolibdato eta 500 µl %10 azido askorbiko gehitzen dira, tutuak bortexarekin nahasten diren bitartean. Laginak orduan 10-15 minutuz 100°C-ra inkubatzen dira.
- 4- Absorbantzia neurketa: Amaitzeko, absorbantzia neurtzen da 812 nm-ra Amersham Biosciences-en (Piscataway, NJ, USA) Ultrospec 500 pro spektrofotometroa erabiliz.

#### **2.1.1.3.2 Argi dinamikoaren dispertsioa**

Estrusio (LUVak) edo sonikazio (SUVak) ostean, besikula populazioaren tamainaren banaketa profila zehaztua izan da argi dinamikoaren dispertsio teknika erabiliz (DLS, ingelesetik *Dinamic Light Dcattering*). Teknika optiko hau partikulen tamaina neurtzeko oso erabilia da (Hunter & Frisken, 1998; Jin *et al.*, 1999; Schurtenberger *et al.*, 1984).

**DLSaren fisika.** DLS esperimentu batean, laser sorta soluzioaren azalera txiki batean fokatzen da eta argia laginean dauden partikulengatik dispertsatzen da fokatutako azalera zeharkatzen duen heinean. Partikulen mugimendu Brownianoak dispertsatutako argiaren faseari ausazkotasuna ematen dio, horrela bi molekula edo gehiagoren argi dispertsioa gehitzen denean, interferentzia suntsizaille edo konstruktiboa emango da. Honek argi dispertsioaren intentsitatean denboraren menpeko gorabehera dakar, zeina bigarren mailako korrelazio funtzio baten bitartez kuantifikatu daitekeen:

$$g^{(2)}(\tau) = A(1 + \beta(g^{(1)}(\tau))^2)$$

non,  $\tau$  argiaren intentsitatearen autokorrelazio denbora den, **A** oinarri lerroa,  **$\beta$**  tresnari dagokion efizientzia faktorea da, eta  $g^{(1)}$  lehen-mailako autokorrelazio funtzioa da. Mugimendu Brownianoa duten partikulentzat,  $g^{(1)}$  autokorrelazio denborarekiko gutxipen esponentziala du, eta bai argi dispertsioarekin asoziatutako bektorearen moduloaren( $q$ ) eta baita partikulen difuzio koefizientearen ( $D$ ) menpekoa da, horrela,

$$g^{(1)}(\tau) = \sum I_i \exp(-D_i q^2 \tau)$$

Besikula populazioaren tamainaren banaketa difusio koefizientetik lortzen da Stokes-Einsten ekuazioak dioenez:

$$R_h = kT / 6\pi\eta D$$

non **D** difusio koefizientea, **k** Boltzmann konstantea, **T** tenperatura,  **$\eta$**  medioaren biskositatea eta **R<sub>h</sub>** partikula esferikoen erradio hidrodinamikoa den.

Neurketetarako laginaren 50  $\mu$ L ipintzen dira kubetan 0.5 mM-eko kontzentrazioa. Laginak Malvern Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern, Instruments, UK) batean aztertu izan dira, kubeta akriliko estandarretan eta 5 mW ( $\lambda = 633$  nm) He-Ne laser sorta baten pean.

Besikulak dispertsatutako argia laser sortari perpedikularki kokatutako fotomultipladore batek detektatzen du. DLS-gailuak emandako txostenean,  $R_h$  balioa polidispersio (PDI) balio batekin batera agertzen da, honek laginaren inguruko informazioa ematen du, hau da, laginaren besikulen tamainaren banaketa homogeneoa edo heterogeneoa den esaten digu. PDI balioa 0 eta 1 artean dago, 0tik hurbil dauden balioak lortuz gero soluzioa garbia homogeneoa eta monodispersioa dela esan nahi du.

## 2.1.2. OSAGAI PROTEIKOA

### 2.1.2.1 Biologia molekularreko metodoak

Biologia molekularreko teknikei esker, intereseko proteina kodetzen duen DNA sekuentzia isolatu, purifikatu eta aldatzea posiblea da. Lan honetan, estandarizatutako DNA teknikak erabili dira BOKen cDNA, bakterio zein ugaztunetan adierazteko bektoretan klonatzeko eta baita DRP1en mutanteak ekoizteko ere.

#### 2.1.2.1.1 DNA amplifikazioa eta klonaketa

Guri interesatzen zaigun DNA klonatzeko, DNA zatikia PCR bidez amplifikatzen da eta itu plasmidoan sartzen da, bektore ere deitua hain zuzen ere. Prozesua hurrengo pausuetan banatu daiteke (2.4 Irudia):

1) Hasleak diseinatu; 2) PCR bidez amplifikatu; 3) Liseritu; 4) DNA purifikatu; 5) Ligatu; 6) *E.coli*n trasformatu; 7) Erauzi eta 8) Intsertoaren presentzia baieztatu.

1. Hasleak diseinatu: Aurrerako eta atzerako hasleak, itu bektorean ligatu ahal izateko murrizte gune egokia dutenak, sintetikoki sintetizatuak izan ziren Sigma Aldrich-engatik (Madrid, Spain).

Hasleak 25 eta 45 base arteko luzera izan behar du, urtze tenperatura ( $T_m$ )  $\geq 78^\circ\text{C}$  izan behar du eta GC kopurua gutxienez %40koa eta gehienez %60koa izan behar du.

2. PCR bidezko anplifikazioa eta purifikazioa: Interesezko cDNAk PCR bidez anplifikatu dira MastercyclerProThermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) erabiliz, PfuTurbo DNA Polimerasa (Agilent Technologies, Santa Clara, CAL, U.S.A) eta hurrengo taulan agertzen diren hasle, DNA patroia eta dNTP kantitateak (2.1 Taula).

DNA patroia (100 ng/ $\mu\text{l}$ -ra dagoen stocketik)	2 $\mu\text{l}$
Aurrerako haslea (100 ng/ $\mu\text{l}$ -ra dagoen stocketik)	1 $\mu\text{l}$
Atzerako haslea (100 ng/ $\mu\text{l}$ -ra dagoen stocketik)	1 $\mu\text{l}$
dNTPak (100 mM-era dagoen stocketik)	0.4 $\mu\text{l}$
Polimerasa indargetzailea X10	5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	40 $\mu\text{l}$
PFU Turbo Polimerasa (2.5 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$

**2.1 Taula. PCR anplifikazio baldintzak.**

PCRa hurrengo taulan azaltzen diren PCR baldintza orokorrak erabiliz gauzatu da (2.2 Taula).

Pausua	Temperatura	Denbora	Ziklo
Desnaturalizazioa	95°C	2 min	X1
Desnaturalizazioa	95°C	30 seg	
Parekaketa	Haslearen $T_m - 5^\circ\text{C}$	30 seg	X30
Luzapena	72°C	2 min Kb-ko	
Luzapena	72°C	10 min	

**2.2 Taula. BOK cDNA anplifikaziorako erabilitako PCR baldintzak.**

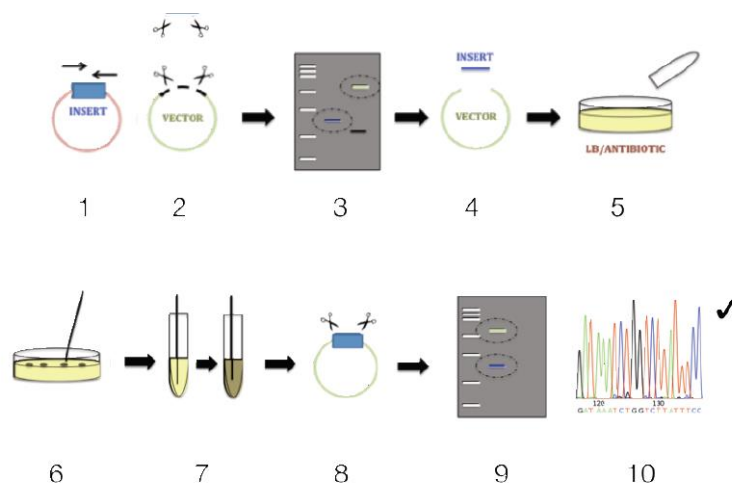
PCR produktua purifikatzen da ondoren, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, California, U.S.A.) erabiliz.

3. Liseriketa: Bai PCR produktua bai itu bektorea errestrikzio entzima (New England Biolabs, Canada) berdinekin liseritzen dira 1 orduz 37°C-tara. Bektorea berez ligatu ez dadin, defosforilatzen da, shrimp alkaline fosfatasarekin (USB Corp, Cleveland, OH, U.S.A) ordu batez 37°C-tara inkubatuz. Errestrikzio entzimak eta baita fosfatasa alkalinoa ere, 20 minutuz 65°C-tara berotuz inaktibatzen dira.

4. Liseritutako produktuen purifikazioa: Liseritutako produktuak Loading Dye Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A) erabilia diluitzen dira, ondoren %1-2 agarosa geletan kargatu eta geletik purifikatu dira QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, California, U.S.A.) erabilia.

5. *E.coli*n trasformatu: Ligatutako produktuen transformaziorako, ligazio nahasketa XL10-Gold zelula ultrakonpetenteen 50 µl-tara (Agilent Technologies, Santa Clara, CAL, U.S.A) gehitzen da. Zelulak 15 minutu izotzetan inkubatu ostean, 90 segunduz 42°C-tara txoke-termikoa ematen zaie. Berehala bakterio eta DNA nahasketa izotzetan sartu eta 2 minutuz inkubatzen da, zelulak berreskuratu daitezten. Gero, nahasketa 1 ml Luria Broth (LB) mediodun tutu batera gehitu eta 45 minutuz 37°C-tara irabiatuz inkubatzen da. Amaitzeko, zelulak 8000x g-tara zentrifugatzen dira mahai-zentrifugagailu batean minutu batez. Jalkina 50 µl- tan berresekitu eta antibiotiko egokia duen agar plaka batera gehitzen da eta gaua osoan zehar inkubatzen da 37°C-tara.

6. Intsertoaren presentziaren baieztapena: Zenbait kolonia agar plakatik pikatu eta antibiotiko egokiak dituen 5 ml LB mediotan hazten dira 37°C-tara inkubatuz gau osoan zehar. DNA plasmidikoaren isolaketarako, zelulei lisi alkalinoa eragiten zaie eta ondoren DNA purifikazioa egiten da miniprep spin kita (Qiagen, California, U.S.A) erabiliz, fabrikatzailearen argibideak jarraituz. DNA kontzentrazioa laginaren absorbantzia 260 nm-tara neurtuz zehazten da eta bere purutasuna 260 nm eta 280 nm-tara jasotako absorbantzien erratioetik zehazten da (A260/A280). Absorbantzien neurketak Nanodrop™ espektrofotometroan (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A) egin dira. Intsertoaren presentzia baieztatzeko, DNA murrizte-entzima egokiekin liseritua izaten da ordu batez 37°C-tara inkubatuta laginaren elektroforesia burutzeko ondoren. Behin intsertoaren presentzia baieztatuta eta PCR bidezko anplifikazioan DNAn emandako edozein mutazio baztertzeko, lagina sekuentziatzera bidaltzen dugu (Secugen S.L, Madrid, Spain).



**2.4 Irudia. Klonazio pausu orokorrak.** 1)PCR anplifikazioa; 2)Liseriketeta; 3)Purifikazioa; 4)Ligazioa; 5)*E.coli*-n transformazioa; 6-7) DNA isolaketa; 8-10)Intsertoaren presentziaren baieztapena.



### 2.1.2.1.2 Mutagenesi generatua

*In vitro* mutagenesi generatua proteinen egitura eta funtzioa aztertzeko balio handiko teknika da. Mutagenesi generatua aurrera eramateko erabili den sistema komertzialak (*Stratagene's QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit*) helize-bikoitzeko plasmido batean mutazio generatuak eragiteko prestatuta dago. Beraz, hau erabiliz azpi-klonazio prozeduren, DNA-bektore zehatzen, murrizte-entzimen edota transformazio ugarien beharra desagertzen da. Erabilitako prozedura zehatza 5.Protokoloan azaltzen da.

#### 5. Protokoloa Mutagenesi generatua

- 1- Hasleen diseinua: Mutazio zehatz bakoitzerako hasle zehatzak diseinatu dira. Hauek mutazio zehatz baten bi aldeetara inguratzen duten aldatu gabeko nukleotido sekuentzia batzuek osatua dago. Hasleen luzera 25 eta 45 base-pare artean egon behar du, urtze tenperatura ( $T_m$ )  $\geq 78^\circ\text{C}$  egon eta GC nukleotidoen kantitatea %40-koa izan behar du. Diseinatutako hasleak Sigma-Aldrich enpresak sortu ditu.
- 2- Nahasketaren prestakuntza: Erreakzio lagina erabilitako *Stratagene's QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* eskuliburuan zehatzen den moduan prestatzen da (2.3 Taula).

1.	5 $\mu\text{l}$	10 $\times$ indargetzailea
	5–50 ng	DNA moldea
	125 ng	Hasle#1
	125 ng	Hasle #2
	20 mM	dNTP nahasketa
	ddH <sub>2</sub> O beharrezko bolumena 50 $\mu\text{l}$ –ra arte	
2.	2.5 U	PfuTurbo, DNA polimerasa

**2.3 Taula. Erreakzio laginaren prestakuntzarako beharrezko kantitateak.**

(Protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

## 3- Tenperatura-zikloak:

Zatiak	Zikloak	Temperatura	Denbora
1	1	95°C	30 seg
2	16	95° C	30 seg
		55°C	1 min
		68°C	1 min/kb plasmido luzera
3	1	4°C	

**2.4 Taula. Mutagenesi guneratuaren metodarako erabilitako tenperatura-zikloen ezaugarriak.**

- 4- Anplifikatutako produktuaren liseritzea: Laginari Dpn I murrizte-entzimaren (10 U/μl) 1 μl gaineratzen zaio eta ordu batez 37°C-tan inkubatzen da, metilatutako DNA moldea liseritzeko.
- 5- XL1-Blue gaitutako zelulen transformazioa: Tetraziklinarekiko erresistenteak diren XL1-Blue gaitutako bakterioen 50 μL-ko lagin bat izotzetan mantenduz desizozten da. Liseritutako DNA-laginaren 1 μL zeluletara gaineratu eta nahasketa 30 minutuz izotzetan inkubatzen da. Ondoren, transformazio nahasketa 45 segundoz 42°C-tan berotzen da. Behin 500 ml hazkuntza-inguru gehituta, kultiboa ordu batez 37°C-tan inkubatzen da, irabiatzen den bitartean. Laginak zentrifugatu ostean jalkina bolumen txikiago baten berresekitzen da. Lortutako bakterioen esekidura plasmido-bektorearentzako antibiotiko egokia duen agar-plaka batean ereiten da. Agar-plaka hau 16 ordu baino gehiagoz 37°C-tan inkubatzen da. Azkenean, DNA plasmidoa *QIAprep Spin Miniprep Kit*<sup>®</sup> erabiliz erauzten da.
- 6- Sekuentziaren determinazioa: Mutatutako DNA lagina sekuentziatzera bidaltzen da, mutazio egokia txertatua duela eta gainontzeko aldaketarik ez duela ziurtatzeko.

Tesi lan honetan, proteinen aldaera ezberdinak erabili dira. 2.5 Taulan ageri direnak, aurretik azaldutako protokoloa erabiliz egin dira.

Mutazioa	Hasleak
DRP1 K557-560A	F: 5´-CTGGAGAGGAATGCTGGCAACTTCAGCAGCTGAAGAGTTATTAGC-3´ R: 5´-GCTAATAACTCTTCAGCTGCTGAAGTTGCCAGCATTCTTCTCCAG-3´
DRP1 K569-571A	F: 5´-AGTTATTAGCAGAAGAAGCATCAGCACCCATTCCAATTAT -3´ R: 5´-ATAATTGGAATGGGTGCTGATGCTTCTTCTGCTAATAACT-3´
DRP1 K557-560-569-571A	Arestian aipatutako bi hasle bikoteak erabili dira era sekuentzial batean.

## 2.5 Taula. Mutagenesi generatuaren bidez egindako DRP1en mutazioak eta erabilitako hasleak.

### 2.1.2.2 Proteinen arazketa

Proteina birkonbinatuen erabilera asko hazi da azkenengo urteetan. Garai batean bere ekoizpena adituen eskuetara mugatuta egon arren, sistema simple eta komertzialen garapena dela eta, arazketarako beharrezko teknologia asko hedatu da. Nahiz eta aurrerakuntza tekniko garrantzitsuak eman diren, proteina birkonbinatuak araztea erronka handia da oraindik ere, batez ere, purifikazio estrategia ona diseinatzeko momentuan hartu behar diren erabakiak direla eta.

BCL2 familiako proteinei dagokionez, kide gehienek C-terminalean sekuentzia hidrofobikoak dituzte, mintz intrazelularretara bideratuak izan daitezten. Horretaz gain, eskualde horrek funtzio apoptotikoan duen papera kritikoa dela adierazten duten ebidentzien metaketa dela eta, luzera osoa duten BCL2 proteinen ekoizpena litzateke egokiena. Hala ere, eskualde honen natura hidrofobikoa dela eta, batzuetan detergenteen beharra dago disoluzio urtsuetan disolbagarriak izan daitezten. Zenbaitetan, detergenteak gehitzea ez da nahikoa luzera osoa duten proteinak lortzeko, hortaz, C-terminaleko sekuentzia hidrofobikoa faltan duten proteinak ekoitzi behar dira. Tesi honetan erabilitako proteina batzuk C-terminaleko sekuentziarik gabe ekoiztu dira aipatutako arazketa arazoak direla eta. DRP1 proteinarene kasuan luzera osoko proteinak erabili izan dira.

#### 2.1.2.2.1 Plasmidoak

Proteina birkonbinatuen adierazpenerako erabili diren plasmidoak hurrengo taulan azaltzen dira (2.6 Taula):

Bektorea	Proteina	Deskribapena	Fenotipoa	Erreferentzia
pGEX-6p-3	Giza BOKΔC	GST sekuentzia bat du, ondoren preScission proteasaren mozketagune bat N-terminalean	Amp <sup>r</sup>	GE Healthcare
pTYB1	Giza BAX	Kitina batuketa domeinu bat gehi inteina auto-mozketagune bat C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	NEB
pRSETb	Giza BAKΔC	6-histidina isatsa, lipoil zatiki bat eta TEV proteasak mozteko sekuentzia ditu N-terminalean	Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pET15b	Giza BIMs	6-histidina isatsa eta tronbina proteasarentzako mozketagune bat du C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	Novagen
pJexpress 434	Giza PUMA, NOXA, BMF, HRK, BID and BAD	6-histidina isatsa eta tronbina proteasarentzako mozketagune bat du C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	DNA 2.0
pJexpress 434	Giza BCLXLΔC	6-histidina isatsa eta tronbina proteasarentzako mozketagune bat du C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	DNA 2.0
pQE-9	Giza BCLXLΔC	6-histidina isatsa du N-terminalean	Amp <sup>r</sup>	Quiagen
pGEX-6P-3	Sagu MCL1ΔC	GST sekuentzia bat du, ondoren preScission proteasaren mozketagune bat N-terminalean	Amp <sup>r</sup>	GE Healthcare
pTYB1	Giza isoforma 1	DRP1 Kitina batuketa domeinu bat gehi inteina auto-mozketagune bat C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	NEB
pTYB1	Giza isoforma 2	DRP1 Kitina batuketa domeinu bat gehi inteina auto-mozketagune bat C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	NEB
pTYB1	Giza isoforma 3	DRP1 Kitina batuketa domeinu bat gehi inteina auto-mozketagune bat C-terminalean	Amp <sup>r</sup>	NEB

#### 2.6 Taula. Proteina birkonbinatuen arazketarako erabiltzen diren bektoreak.

▪ **BCL2 proteina antiapoptotikoak:** N-terminaleko 151 aminoazido eta C-terminaleko 23 aminoazido faltan dituen sagu GST-MCL1 (MCL1ΔC) eta C-terminalean 24 aminoazido faltan dituen giza 6His-BCLXL plasmidoak (BCLXLΔC), HG Wang doktoreak (Walter and Eliza Hall Institute, Australia) adeitasunez eman izan dizkigu.

Bestalde, giza BCLXLΔC eta giza MCL1Δ-en cDNAk DNA 2.0k sintetikoki ekoiztu eta pJexpress 434 bektorean klonatuak izan dira. Geneen ekoizpenean 6-histidinatako isatsa eta tronbina proteasak mozteko gunea gehitu izan zaizkie.

▪ **BH3-domeinu bakarreko proteinak:** Giza BIMS cDNA HG. Wang Doktoreak (University of Texas, U.S.A) adeitasunez emanda izan da. PCR bidez amplifikatu zen *PfuTurbo* DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CAL, U.S.A) erabiliz. *NdeI* and *BamHI* murrizte-guneak gehitu izan zaizkio aurrerako eta atzerako hasleekin. PCR bidez amplifikatutako produktua liseritu eta aurretiaz liseritu eta defosforilatutako pET15b (Millipore Corporation, Billerica, M.A, U.S.A) bektorearekin ligatu izan da. Beste BH3 guztien cDNAk (PUMA, NOXA, BMF, HRK, BID and BAD) DNA 2.0k (Menlo Park, CA, U.S.A) sintetikoki ekoiztu eta pJexpress 434 bektorean klonatuak izan dira. Sekuentziek *E.coli* BL21 (DE3) (Welch *et al.*, 2009) anduian adierazteko kodoi optimizazioa dute. Kodoi optimizazioaz gain, 6-histidina isatsa eta tronbina proteasak mozteko gunea (LVPRGS) gehitu izan zaizkie N-terminalean gene sintesian zehar.

▪ **BAX-motatako proteina proapoptotikoak:** C-terminaleko azken 24 aminoazidoak faltan dituen eta 6-histidina isatsa duen giza BOK birkonbinantea (BOKΔC) DNA 2.0k (Menlo Park, CA, U.S.A) sintetikoki ekoiztu eta pGEX-6P-3 bektorean klonatua izan da. Bektoreak GST sekuentzia bat du, preScission proteasak mozteko gunea (LEVLVQ/GP) ere badu eta proteina sekuentziak *E.colin* adierazteko kodoi optimizazioa ere badarama.

C-terminaleko azken 21 aminoazidoak faltan dituen giza BAK (BAKΔC) Begoña Sot (Cambridge, UK) Doktoreak adeitasunez eman izan digu. Bektorea pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A) bektoretik eratortzen da eta TEV proteasarentzako mozketa gune [ENLYFQ (G/S)] bat jarraian duen lipoil zatiki bat kodetzen duen N-terminal sekuentzia laburra du.

Luzera osoa duen giza BAX adierazteko plasmidoa M. Suzuki (NIH, Bethesda) Doktoreak adeitasunez bidalia izan da. Plasmidoa pTYB1 (New England Biolabs, Canada) plasmidotik eratorritako plasmidoa da. BAX cDNA *NdeI/SapI* guneen artean azpiklonatu da. Amaierako plasmidoak, pTYB1-BAX, BAX eta C-terminalean kitina lotzeko gunea gehi inteinak mozteko guneaz osatutako fusio proteina kodetzen du. Mozterakoan BAX proteina lortzen delarik inongo aminoazido extra edo trunkaketarik gabekoa (Suzuki *et al.*, 2000).

▪ **DRP1:** Giza DRP1 isoforma 1, 2 eta 3 konstruktoak DRP1 ORFaren PCR bidezko amplifikazioz egin dira pET29 bektorean (Dr. C. Blackstone adeitasunez eman ziguna, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, USA) klonatuta hasle espezifikoak erabiliz. Ondoren, PCR produktua murrizte-entzima egokiekin (*NdeI/SapI*) liseritu ostean aurrez linearizatutako pTYB1 bektorearekin ligatu dugularik.

2.1.2.2.2 Escherichia coli anduiak

Hurrengo *Escherichia coli* (*E.coli*) anduiak erabili dira tesi lan honetan (2.7 Taula):

Anduia	Genotipoa	Erreferentzia
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> F-supE44 DlacU169(f80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Grant et al., 1990
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal $\lambda$ (DE3)	Studier eta Moffatt, 1986
BL21 CodonPlus-RIL	<i>E. coli</i> B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal $\lambda$ endA Hte [argU ileY leuW Camr]	Agilent
C41	<i>E. coli</i> F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	Miroux eta Walker, 1996.
C41 pLYs	<i>E. coli</i> F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLYsS (CmR)	
C43	<i>E. coli</i> F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)	Miroux eta Walker, 1996.
C43 pLYs	<i>E. coli</i> F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLYsS (CmR)	
Rosetta(DE3)pLYsS	<i>E.coli</i> F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLYsSRARE (CamR)	NOVAGEN
M15	NalS, StrS, RifS, Thi., Lac., Ara+, Gal+, Mtl., F., RecA+, Uvr+, Lon+	QIAGEN®, © 2001
SG	NalS, StrS, RifS, Thi., Lac., Ara+, Gal+, Mtl., F., RecA+, Uvr+, Lon+	QIAGEN®, © 2001

**2.7 Taula. Lan honetan erabilitako *E.coli* anduiak.**

- **DH5 $\alpha$** : Andui hau zenbait endonukleasa eta DNA konpontze mekanismoetan urria da, horren ondorioz, bakterio hauek oso erabilgarriak dira DNA exogenoaren anplifikaziorako.
- **BL21 (DE3)**: Andui honek lon eta Omp-t proteasen urritasuna du eta horregatik, toxikoak ez diren geneen adierazpenerako egokia da. Bakterio andui hau BOKAC, BH3-domeinu bakarreko proteinak (PUMA, NOXA, BMF, HRK, BID and BAD) eta proteina antiapoptotiko guztien adierazpenerako erabili da.
- **BL21 CodonPlus-RIL**: Kimikoki kompetenteak diren BL21-CodonPlus-RIL zelulek argU, ileY, and leuW tRNA geneen aparteko kopiak dituzte. Gene hauek kodetzen dituzten tRNAk

AGA/AGG (arginina), AUA (isoleuzina), eta CUA (leuzina) kodoiak ezagutzen dituzte, hurrenez hurren. Andui hau BIMS eta BAX adierazteko erabili da.

- **C41:** Organismo mota guztietako, (birusak, eubakteriak, arkeoak, legamiak, landareak, intsektuak eta ugaztunak barne) proteina toxiko eta mintz proteinak adierazteko eraginkorrak dira. C41 (DE3) anduia BL21(DE3) [E.coli F ompT hsdS B (r B -m B -) gal dcm (DE3)] anduiatik eratorria da. Andui honek gutxienez karakterizatu gabeko mutazio bat du, zeina proteina toxiko askoren adierazpenarekin erlazionatutako heriotza zelularra ekiditen duen.

- **C41 pLys:** C41 anduiak dituen ezaugarriak izateaz gain, andui honek pLys plasmidoa ere badu, T7 lizozima ekoizten duena intereseko genearen oinarritzko adierazpena murriztuz.

- **C43:** Organismo mota guztien (birusak, eubakteriak, arkeoak, legamiak, landareak, intsektuak eta ugaztunak) proteina toxikoak eta mintz proteinak adierazteko eraginkorra da.

- **C43 pLys:** C41 pLys anduiak bezala, pLys plasmidoa du andui honek, T7 lizozima ekoizten duena intereseko genearen oinarritzko adierazpen murrizten delarik, horretaz gain C43 anduiak dituen ezaugarriak ere baditu.

- **Rossetta:** Rosetta anduia BL21 lacZY (Tuner&trade;) anduiaren eratorria da, *E.colin* oso gutxitan erabiltzen diren kodoiak dituzten proteina eukariotikoen adierazpena handitzeko diseinatua. Andui honek AUA, AGG, AGA, CUA, CCC eta GGA kodoientzako tRNAk ditu kloranfenikolarekiko erresistentzia duen plasmido batean.

- **M15:** *E. coli* M15 anduiak lacZ genean M15 delezioa du (Beckwith, 1964). Andui hau P.J Zamenhofek eraiki zuen eta Villarejo eta Zabin-en (1974) argitalpenean aipatzen da. M15 delezioa  $\beta$ -galaktosidasaren  $\alpha$ -zatiaren presentziarekin osatzen da. Harrigarriki, lambda fagoek ezin dute *E.coliren* M15 anduia zoldu eta gainera, andui honetan barneratutako PL promotorea ez da aktiboa.

### 2.1.2.2.2 Proteinaren adierazpena eta arazketa

BCL2 familiako proteinen arazketa protokolo guztiek hasierako zenbait pausu dituzte amankomunean.

#### 2.1.2.2.2.1 Hasierako pausu komunak

**1-Transformazioa:** Bakterioak DNA birkonbinatuarekin trasformatzeko, 50  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$ -*E.coli* zelula kimiokonpetente, 200  $\mu$ g DNA plasmidikorekin inkubatzen dira 20 minutuz izotzetan. DNA

plasmidikoa zelulan sar dadin 90 segunduz 42°C-tara bero-talka eragiten zaie. Zelulak bero-talkaz errekupera daitezten, 20 min inkubatzeko dira izotzetan. Bakterioek antibiotikoarekiko erresistentzia adieraz dezaten 1 ml Luria Broth (LB) medioan, 45 minutuz 37°C-tan irabiatuz inkubatzeko dira. Azkenik, laginak mahai-zentrifugagailuan 14,000x g-tara zentrifugatzen dira minutu batez. Jalkina 50 µl LB-rekin berresekitu eta antibiotiko egokia daraman agar plaka batera isurtzen da. Plakak, 37°C-tan gau osoz inkubatzeko dira.

**2-Adierazpena:** Hautespen positibo gisa ezagututako klon bat hartu eta bakterioak 5ml LB –dun matrize batean hazten dira 37°C-tan gau osoz. Bakterio-kultiboa 1 L-ko bolumenerarte eskalatuz joaten da. Proteinen adierazpen desberdintasun eta proteolisiari sentikortasun desberdina dela eta, indukzio eta adierazpen denborak kasu bakoitzerako optimizatu egin behar dira (2.8 Taula). IPTG-rekin induzitu ostean, bakterioak taulan agertzen diren tenperaturaren eta denboraren zehar inkubatzeko dira. Ondoren bakterio-kultura 5000x g-tara zentrifugatzen da Beckman Coulter zentrifugagailu eta JLA-9.100 errotorea (Beckman Coulter, Fullerton, California, U.S.A) erabilita. Gainjalkina bota eta jalkinak -80°C-tara gordetzen dira hurrengo purifikazio pausuekin hasi arte.

Proteina	Kultibo medioa	O.D 600nm (u.a)	[IPTG] mM	Adierazpena	A Tanpoia
BOKΔC	LB	0.6	1	18h 20°C	150mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA (pH 7.5)
BAKΔC	LB	0.6	0.5	18h 20°C	500mM NaCl, 20mM imidazol, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.5)
BAX	TB	1.5	1	18h 20°C	100mM NaCl, 20mM Tris (pH 8)
Antiapoptotik oak (GST)	LB	0.6	0.5	18h 20°C	150mM NaCl, 50mM Tris, 1mM EDTA (pH 7.5)
Antiapoptotik oak (6His)	LB	0.6	0.5	18h 20°C	500mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 20mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.5)
BH3	LB	1	1	4h 37°C	500mM NaCl, 20mM imidazol, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 20mM Tris(pH 8), %1 CHAPS
DRP1	LB	0.9	0.5	12h 18°C	20mM HEPES pH8, 500mM NaCl, 1mM MgCl <sub>2</sub>

**2.8 Taula. Proteina birkonbinatuaren adierazpen eta arazketarako baldintzak.**

**3-Bakterioen lisia:** Bakterio jalkinak, 1 mg/ml liozima (Sigma-Aldrich), 1 mM TCEP (Sigma-Aldrich), proteina inhibitzaileak (Roche, Basel, Switzerland), 2.5 µg/ml DNAasa (Sigma-Aldrich) eta %10 glizerola gehituta dituen A tanpoi egokian bersuspenditzen dira (2.8 Taula). Ondoren, 2 orduz 4°C-tan inkubatzeko dira, irabiagailu orbital batean, liozimak bakterioen horma zelularra



lisatu dezan. BH3-domeinu bakarreko proteinen kasuan, %1 CHAPS (w/v) gehitu behar zaio lisi-indargetzaileari, proteinen disolbagarritasuna bermatzeko. BH3-domeinu bakarreko proteinak eta BAK $\Delta$ C proteinen kasuan laginak izotzetan sonikatu behar dira 4x(10on/10off/10sec) programa jarraituz. BOK $\Delta$ C, BAX eta DRP1 proteinen kasuan, sonikazioak proteinen agregazioa dakar. Arazo hau ekiditeko, zelulak presio altuko Emulsiflex-C5 homogenizatzailea (Avestin, Ontario, Canada) erabilia apurtzen dira 17,000psi –tara. Ondoren, apurtutako zelulak 20,000x g-tara zentrifugatzen dira 4°C-tan 30 minutuz. Jalkina baztertu eta gainjalkina izotzetan mantentzen da, arazketarekin jarraitzeko.

#### 2.1.2.2.2.2 GST fusio proteinak

##### 2.1.2.2.2.2.1 BOK $\Delta$ C

GST- BOK $\Delta$ C afinitate kromatografia bidez arazkatzen da "Glutathione Sepharose 4B beads" erretxina (GE Healthcare) erabilia. Bakterio-kultura jalkin bakoitzeko (2 litro bakterio-kultura) 1 ml erretxina erabiltzen da. Lehendabizi, erretxina zentrifugazio bidez (500x g, 5 min), hiru bider ur destilatuarekin eta beste hiru bider dagokion A indargetzailearekin garbitzen da. Lisatutako bakterioen gainjalkina garbitutako erretxinarekin nahastu eta 2 orduz inkubatzen da 4°C-tan irabiatzaile orbital batean GST-isatsa eta glutation erretxinaren arteko lotura baimentzeko.

Proteina itsatsita duen erretxina ponpa peristaltiko batera konektatutako zutabe batean paketatzen da. Paketatu ondoren, zutabea A indargetzailearen 5 erretxina-bolumen erabiliz garbitzen da. Amaitzeko 30  $\mu$ L (Stock: 2000 unitate/ml) PreScission protease (GE Healthcare, Waukesha, WI, U.S.A) gaineratzen zaizkio zutabeari eta gau osoan zehar 4°C-tan inkubatzen uzten zaio. Hurrengo egunean moztutako proteina A indargetzailearekin eluitzen da 1 ml-tako frakzioak jasotzen direlarik. Ondoren, frakzioak SDS-PAGE gel baten bidezko bereizketa eta Coomassie urdin tindatzaile erabiliaz analizatzen dira. Proteinan aberastuta dauden frakzioak A indargetzailean orekatutako Superdex<sup>TM</sup> 75, tamainaren arabeko bereizketa burutzen duen zutabearekin, txertatzen dira.

##### 2.1.2.2.2.2.2 Proteina antiapoptotikoak

GST-MCL1 $\Delta$ C afinitate kromatografia bidez arazten da "Glutathione Sepharose 4B bead" erretxina (GE Healthcare) erabilia, Etxeberria *eta* *lank.*, 2008 argitalpenean azaldutako prozedura jarraituz.

Bakterio-kultura litro bakoitzeko, 750  $\mu$ l erretxina erabiltzen da. Lehendabizi, erretxina zentrifugazio bidez (500x g, 5 min), hiru bider ur destilatuarekin eta beste hiru bider dagokion A indargetzailearekin garbitzen da. Lisatutako bakterioen gainjalkinak garbitutako erretxinarekin

nahastu eta 4 orduz irabiagailu orbital batean inkubatzen dira 4°C-tara, modu horretan, Glutation S-transferasa glutationera itsatsiko delarik.

Proteina itsatsita duten bead-ak ponpa peristaltiko batera konektatuta dagoen zutabe batean enpaketatuko dira. Ondoren, A tanpoiaren 5 bed bolumenekin garbitu eta 30 µL (Stock: 2000 unitate/ml) PreScission proteasa (GE Healthcare, Waukesha, WI, U.S.A.) gehituko zaio. Zutabea tapatu eta gau osoan zehar 4°C-tara izango dugu, proteasak ondo moztu dezan. Moztutako proteina A tanpoiarekin eluituko da 0.5 ml-tako frakzioak jasoz, frakzio hauek SDS-PAGE bidez analisatuko dira Coomassie urdinarekin tindatuz. Proteinan aberastutako frakzioak kontzentratu eta Superdex™ 200 HR 10/30-gel iragazpeneko zutabean kargatuko dira, behin zutabea KHE indargetzailean orekatuta dagoenean.

#### 2.1.2.2.2.3 6 His isatsa duten proteinak

##### 2.1.2.2.2.3.1 BAKΔC

6His-isatsadun BAKΔC Landeta *eta lank.*, 2011 azaltzen den bezala araztu da. BAKΔC afinitate kromatografia erabilia isolatzen da, “ni-NTA Superflow beads (Qiagen)” erretxina erabilia. Bakterio-kultura litro bakoitzeko, 500 µl erretxina erabiltzen da. Bead-ak lehenengo eta behin hamar bed bolumen ur distilatuarekin garbitzen dira hiru bider 500x g-tara 5 minutuz zentrifugatuz, ondoren prozedura bera errepikatzen da dagokion A tanpoiarekin. Behin garbi daudenean bakterio lisatuekin nahastu eta 4 orduz 4°C-tara inkubatzen dira irabiagailu orbital batean, horrela, proteinak daraman 6His-isatsa Ni-NTA duten bead-etara itsatsiko da. Proteina lotuta daramaten bead-ak zentrifugazio bidez jaso (500x g, 5 min, 4°C), gainjalkina baztertu eta jalkina ponpa peristaltiko batetara konektatutako zutabe batean enpaketatzen da.

5 bead bolumen A tanpoiarekin garbitu ostean, proteina B tanpoiarekin (A tanpoia 20 mM imidazole beharrean 500 mM imidazolearekin) eluitzen da eta 0.5 ml-tako frakzioak jasotzen dira, SDS-PAGE analisi eta Coomassie-urdin tindaketarako. Proteinan aberastutako frakzioak gaua osoan zehar dializatzen dira 2 litro C tanpoian (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH8), 500 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, %10 glizerol) 4°C-tara, dializirako zelulosako mintza (Sigma-Aldrich) erabilia. Dializatutako laginak 10 µl (stock: 10units/µl) AcTEV proteasarekin (Invitrogen) inkubatzen diran 30°C-tara 3 orduz. Ondoren laginak ordu batez Ni-NTA Superflow bead-ekin inkubatzen dira moztu gabeko proteina -Lipoil-arekin batu dadin. Nahasketa 18,000x g –tara zentrifugatzen da 30 minutuz. Lortutako gainjalkina 250 µl–tara kontzentratzen da YM-10 Microcons (Millipore) erabilia eta 1 mM TCEP eta %10 glizerola duen KHE tanpoian (100 mM KCl, 10 mM Hepes (pH7.5) eta 1mM EDTA) orekatutako Superdex™200HR 10/30 gel iragazpeneko zutabean kargatzen da.

#### 2.1.2.2.3.2 BH3-domeinu bakarrekoko proteinak

6His-isatsa duten BH3-domeinu bakarrekoko proteinak BAKΔC proteina arazteko ematen diren hasierako pausu berdina jarraituz isolatzen dira.

Eluitu ostean, proteinan aberastutako frakzioak 250 μl-taraino kontzentratzen dira YM-10 Microcons (Millipore) erabilia eta ondoren, C indargetzailean (500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH8), %10 glizerol eta %1 CHAPS (w/v)) orekatutako Superdex™ 200 HR 10/30 tamainaren arabera bereizpena egiten duen zutabea (GE Healthcare) txertatzen dira.

Laginen eluzioa 0.5 ml/min-ko fluxuarekin 4°C-tan burutzen da; honez gain, proteinen eluzioa 280 nm-tara absorbantzia neurtuz jarraitu izan da. Tamaina egokia duen pikoari dagokion frakzioak jaso eta SDS-PAGE eta Coomassie-urdin bidez aztertzen dira.

#### 2.1.2.2.3.3 6His isatsa karboxi-terminalean duten proteina antiapoptotikoak

6His isatsa karboxi terminalean duten proteina antiapoptotikoak BAKΔC-ren arazketarako erabilitako prozedura berdina jarraituz arakutzen dira.

#### 2.1.2.2.4 BAX

Luzera osoa duen giza BAX Suzuki *eta lank.*, 2000 azaldutako prozedura jarraituz arazten da. Bakterio-kultura litro bakoitzeko, 1 ml chitin beads (NEB) erabiltzen dira. Bead-ak lehenengo eta behin hamar bed bolumen ur distilatuarekin garbitzen dira hiru aldiz eta ondoren prozedura bera errepikatzen da dagokion A tanpoiarekin. Bakterio lisatuen gainjalkina garbitutako bead-ekin nahastu eta gaua osoan zehar inkubatzen da 4°C-tara irabiagailu orbital batean, horrela, BAX kitin bead-etara itsatsiko da. Proteina itsatsita duten bead-ak zentrifugazio bidez jasoko dira, gainjalkina baztertu eta jalkina ponpa peristaltiko batera konektatutako zutabe batean enpaketatuko da. A tanpoiaren 5 bead bolumenekin zutabea garbitu ondoren, zutabea 50 mM DTT duen A tanpoiarekin orekatzen da. Zutabea tapatu eta 48 orduz 4°C-tara gordetzen da inteinaren berezko mozketak gerta dadin. Proteina eluitu ostean, aberastutako frakzioak gaua osoan zehar dializatzen dira 20 mM Tris (pH8) 2 litroren kontra 4°C-tara. Behin dializatuta, BAX aldaketa-ionikoko kromatografia bidez araztuko dugu Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare) zutabea erabilia. Proteina 0 tik 1 Mra NaCl doan gradiente lineala erabilia eluituko dugu eta pikoari dagokion frakzioak elektroforesi eta Coomassie-urdin tindaketa bidez aztertuko dira.

#### 2.1.2.2.5 DRP1

Bakterio lisatuen gainjalkinak jaso eta kitinazko erretxina duen zutabea enpaketatzen dira, A indargetzailean orekatutako 10 ml erretxina erabiliko dugularik (New England Biolabs, Inc.). 10 zutabe bolumen B indargetzailerekin (20 mM HEPES pH 7, %10 glizerol, 1 mM PMSF, 1 mM

benzamidina, 500 mM NaCl) garbituko da zutabea itsatsi ez den proteina zutabetik kentzeko. Ondoren, kitinazko erretxina 0.5 mM DTT duen B indargetzailearekin orekatuko dugu Tiol erreaktiboak eragindako mozketan has dadin. Liseriketa erreakzioa gauean zehar burutuko da 4°C-tara, hurrengo goizean proteina eluituko delarik. Proteinak C indargetzailearekiko (25 mM Hepes pH 7.5, %10 glizerol, 0.5 mM DTT, 100 mM NaCl) dializatuko dira jarraian eta C indargetzailean orekatuak dagoen Q sefrosa zutabea injektatuko dira, DRP1 zutabetik eluituko da indargetzailearen NaCl kontzentrazioa 500 mM-era apurka-apurka igoz. DRP1 duten frakzioak aurretik D indargetzailean (25 mM Hepes pH 7.4, %10 glizerol, 0.5 mM DTT, 150 mM NaCl) orekatutako Sephadex S200 zutabea injektatuko dira ondoren. DRP1 duten frakzioak azkenik E indargetzailearekiko dializatuko dira (25 mM Hepes pH 7.4, %10 glizerol, 0.5 mM DTT, 150 mM KCl).

### 2.1.2.3 Proteinen karakterizazioa

#### 2.1.2.3.1 Proteinen kontzentrazioaren determinazioa

Proteina kontzentrazioa Bradford saiakuntza (Bradford, 1976) erabiliz edota 280 nm-tan absorbantzia neurtuz kuantifikatu da. Jarraian bi metodoen ezaugarri nagusiak azalduko dira:

**Bradford:** Coomassie Brilliant Blue G-250 zundak hondar aromatiko eta positiboak batzen ditu. Batuketa honen ondorioz, uhin luzera maximoa lekualdatzen da 465 nm-tik 595 nm-ra. Proteina kontzentrazioa BSA patroi zuzen batekin alderatuz zehaztu da. Teknika honek detektatu ahal duen proteina kontzentrazio tartea 1-1500 µg/ml da.

**Absorbantzia 280 nm-ra:** Soluzioan dauden proteinek eraztun aromatikodun aminoazidoen presentziagatik, ultramore argia xurgatzen dute 280 nm-eko uhin luzera maximo batera. Egitura sekundario, tertziario eta kuarternarioek absorbantzia baldintzatzen dute; beraz, pH, indar ioniko eta antzeko baldintzek absorbantziaren espektroa alda dezakete. Lambert-Beer-en ekuazioa jarraituz eta iraungipen molarreko koefiziente teoriko bat kalkulatu, proteinaren kontzentrazioa estimatu dezakegu.

#### 2.1.2.3.2 Proteinen bistaratze eta detekzio teknikak

Proteinen bistaratze eta detekzio metodo ezberdinak daude. Atal honetan, proteinak detektatzeko tindaketa metodo ezberdin eta bistaratze azkar batetik detekzio maila txikiagoetara doazenak aztertuko dira (6.Protokoloa).

## 6. **Protokoloa** *Bistaratze eta detekzio teknikak*

Prozedura osoa bitan banandu daiteke: (i) Elektroforesi bidezko bereizketa eta (ii) Detekzioa.

- **Elektroforesi bidezko bereizketa:** Proteinak Laemmli metodoaren arabera bereizi dira (Laemmli 1970). Metodo honetan, proteinak beraien pisu molekularren arabera banatzen dira sodio dodezil sulfatozko poliakrilamidazko elektroforesi gelak erabiliz (SDS-PAGE). %15-eko edo %12-ko poliakrilamidazko gelak eta 20 mM Tris-Cl (pH 7.9), 100 mM NaCl, 70 mM EDTA, 2% (bol/bol) SDS indargetzailea erabili dira.
- **Bistaratze eta detekzioa:**
  - 1- Fluoreszenteki markatutako proteinen detekzioa: Elektroforesi gel bidez banatutako proteina fluoreszenteak zuzenean Molecular Imager Versadoc (Bio-Rad, PA, EEBC) aparatua erabiliz detektatu dira.
  - 2- Coomassie-uridin tindatzailea: Elektroforesi gelak Coomassie-uridin tindatzaile soluzioarekin tindatu dira (%0.1 Coomassie R250, %10 azido azetiko eta %40 metanol) eta ondoren, gela tindagabetzeko %20 metanol eta %10 azido azetiko glaziala duen soluzioarekin proteinen bandak ikusi arte inkubatu da. Erreakzio hau tindatzailearen molekula eta proteinen amino taldeen arteko elkarrekintza elektrostatiko itzulgarri baten oinarritzen da.
  - 3- Western plapaketa (*Immunoblotting* edo *Western blot*): Metodo honetan gainerako pausuak daude:
    - (i)Transferentzia: Geletan dauden proteinak nitozelulosazko mintz batera (Protran nitrocellulose membrane; Whatman Inc, NJ, EEBC) korrante elektriko (12 mV, 45 min) bat dela medio transferitzen dira. Transferentzia burutzeko osagaiak honakoak izaten dira: Transferentzia indargetzailea (20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM NaCl, 70 mM EDTA eta %15 metanol); korrante elektrikoa ematen duen aparatua *Tran-Blot SD* (Bio-Rad, PA, EEBC); eta azkenik, *Extra Thick blot* paperak (Bio-Rad, PA, EEBC).

(Protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

(ii) Blokeoa: Elkarrekintza ez-espezifikoak eragozteko, nitrozelulosazko mintza %5 esne-gaingabetua eta %0.05 Tween-20 duen PBS indagertzailearekin (PBS-T) (137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eta 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7) ordu batez giro tenperaturan inkubatzen dira.

(iii) Detekzioa: Mintza, detektatu nahi den proteina ezagutzen duen antigorputza (1:2000 diluzioa) %2.5 esne-gaingabetua duen PBS-T soluzioan diluitu eta ordu batez giro tenperaturan inkubatzen dira. Ondoren, PBS-T indargetzailearekin 10 minututako hiru garbiketa egin ostean, mintza HRP- (ingelesetik, *horseradish peroxidase*) konjugatutako antigorputz sekundarioarekin (1:10000 diluzioa) ordu batez giro tenperaturan inkubatzen da. Bukatzeko, proteinen detekzioa *ECL-Plus* Western plapaketarako erreaktibo kimioluminiszentearekin (Pierce, Rockford, IL, EEBB) inkubatu eta bistaratzeari *Hyperfilm™ ECL™* argazki filmekin (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, EEBB) burutzen da.

### 2.1.2.3.3 Masa espektrometria

Masa espektrometria analitikoa zelula zein organismoen proteoma aztertzeke erraminta indartsua bilakatu da, gainera proteinen karakterizaziorako ere metodo garrantzitsua da. Tesi lan honetan teknika hau bi helburu desberdin jorrazteko erabili izan da. Lehengoan, araztu berri zen BOKΔC6His proteinaren masa molekularra aztertu da, araztutako proteina BOKΔC6His proteinak izan beharko lukeen masa teorikoarekin bat datorren konfirmatzeko. Horretaz gain, masa espektrometria modu iragankorrean GFP-BOKekin transfektatutako zelulen immunoprezipitazioan presente dauden proteinak identifikatzeko ere erabilia izan da. Kasu honetan, tandem masa espektrometria erabili da. Proteinak entzimekin liseritu eta peptido txikiak lortu ondoren, peptido hauek masa espektrometroan barneratu eta fingerprintng deituriko metodo bitartez identifikatu izan dira. Masa espektrometria saiakuntzak UPV/EHUko Proteomika Unitatean egin dira.

## 2.2 BERRERAIKITAKO EREDU SISTEMEKIN ERLAZIONATUTAKO METODOAK

### 2.2.1 EGITURA AZTERKETAK

#### 2.2.1.1 Proteinen kristalizazioa

Proteinen kristalografia, proteina molekulen egitura bereizmen atomikoan lortzeko erabiltzen da. Proteinen kristalak lortzea erronka handia izaten da, ingurune urtsuaren murrizketak, kalitate handiko proteina laginak lortzeko zailtasunak eta proteinek temperatura, pH, indar ioniko eta beste faktore batzuekiko duten sentikortasuna dela eta. Kristalizazio baldintza egokiak zehazteko askotan baldintza desberdin asko frogatzea beharrezkoa da, kristalizazio baldintza egokia aurkitu arte.

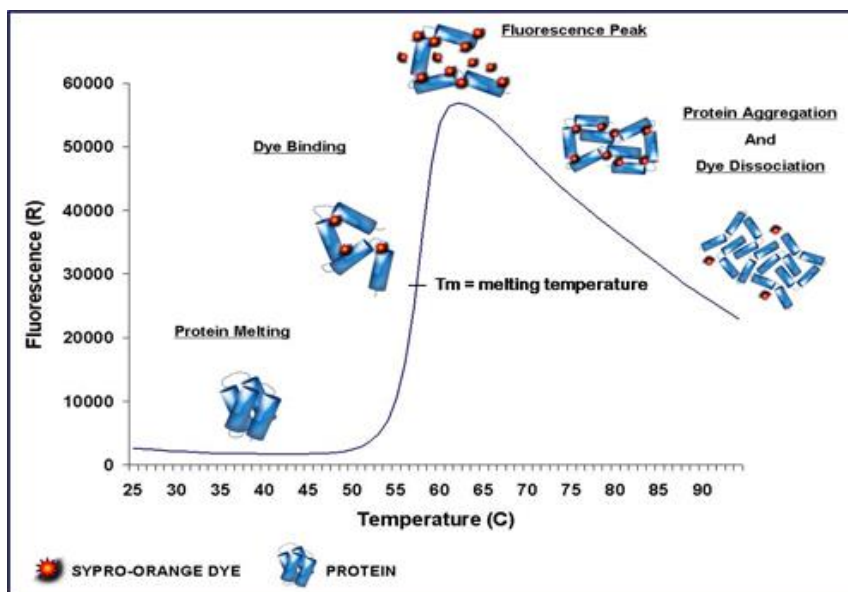
##### 2.2.1.1.1 Proteinaren egonkortasunaren azterketa: Termofluor proba

Proteinen egitura maila atomikoan aztertzeko proteina-laginak hainbat baldintza bete behar ditu. Baldintza horiek betetzen dituen proteina-lagina lortzea askotan prozesu luzea izaten da. Proteina kristalitzatzeko probabilitatea, laginaren homogeneitate, egonkortasun eta disolbagarritasunarekin estuki erlazionatuta dago. Kristalizazioaren arrakasta-tasa hobetzeko proteinaren propietate horien optimizazioak garrantzi handia dauka.

BOK $\Delta$ C6His proteinaren egonkortasunerako egokiena den indargetzailea aurkitzeko asmoz Termofluor proba erabili da. Proba honetan, ikerketa gai den proteinaren egonkortasun termikoa aztertzen da indargetzaile (gatz eta pH desberdinetan) eta ligando/gehigarri desberdin askorekin. Modu honetan era azkar batean disolbagarritasunaren hobekuntza, agregazioaren murrizketa eta, kasu batzuetan, kristalizazio aukeren areagotzea handitzen duten baldintzak identifikatzen dira.

Esperimentua burutzeko 96 putzutako plaka bat erabiltzen da. Plakaren putzu bakoitzari indargetzaile/ligando/gehigarri (JBS Solubility kit, A eta B: Buffer Kit from Jena Biosciences) desberdinen bat gehitzen zaio aztergai den proteinarekin batera. Horretaz gain, putzu bakoitzean, molekula hidrofobikoei batzen den SYPRO orange (Molecular probes) zunda fluoreszentea gehitzen da. Saioa denbora errealean egindako PCRak burutzeko termoziklagailu batean burutzen da. Temperatura handitzen doan heinean proteina desnaturalizatzen hasten da egoera tolestuan ezkutatuak dauden atal hidrofobikoak agerian geratzen direlarik; SYPRO

orange zunda atal hauei batzen da fluoreszentiaren errendimendu kuantikoa handituz (2.5 Irudia).



**2.5 Irudia. Termofluor probaren adierazpen eskematikoa.**  
[http://www.bio.anl.gov/molecular\\_and\\_systems\\_biology/Sensor/sensor2.html](http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html) web orritik hartutako irudia.

Laburbilduz, 0.7 µl 500X Sypro Orange (Molecular Probes), azertu behar dugun indargetzaile/ligando/gehigarri-ren 37 µl eta 1.5 mg/ml-ra dagoen proteinaren 4.5 µl gehitzen dira PCR plakaren (Bio- Rad) putzu bakoitzera. Kontroletan indargetzailea, ligandoa edo gehigarria gehitu beharrean ura gehitzen da. Plakak kalitate optikoa duen estalkiarekin (Bio-Rad) tapatu eta iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) erabilita 20°Ctik 95°Cra berotzen da 0.5°C/min-ko. Putzuetan ematen diren fluoreszentzia aldaketak *charge-coupled device (CCD)* kamera batekin neurtzen dira. Kitzikapen eta igorpen uhin-luzerak 300 eta 470 nm-koak dira hurrenez hurren.

### 2.2.1.1.2 Hauspeatzaileen azterketa

Proteinen kristalizaziorako *screen*-ak erabiltzea aukera egokia da; hauek indargetzaile, hauspeatzaile eta beste gehigarrien bildumak dira. Screen hauetako gehienak 96-putzutako formatuan daude eskuragarri, sistema errobotikoak erabiltzeko pentsatuak. Hasierako esperimenduek, kristalizatu nahi den proteinaren portaeraren inguruko informazio baliagarria eskainiko digute.

Kasu honetan, proteina 2mg/ml-ko kontzentziora dago bere egonkortasunerako egokiena den indargetzailean (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, % 10 glizerol, pH 7.5).



Hiru screen desberdin erabili dira, JBScreen Classic I HTSL, JBScreen Classic II HTSL eta Nextal DWBlock Classic Suite. Putzu bakoitzean 800 nl proteina eta 200 nl indargetzaile gehitu dira mosquito robota erabilita.

Behin 96 putzutako plaka estalita, tantak mikroskopioan behatu eta uniformeak diren ikusten da, baita prezipitaziorik gertatu den ere. Ondoren, plakak 21°C-tara inkubatzen dira eta 21 egunetan zehar ateratzen zaizkie argazkiak.

### 2.2.1.1.3 “Hanging drop” metodoa

Metodo honetan araztutako proteina, indargetzailea eta hauspeatzaileaz osatutako tanta bat, indargetzaile eta hauspeatzaile berdinak dituen ontzi handiago batekin orekatzen utziko da (2.6 Irudia). Hasieran, tantak hauspeatzailearen kontzentrazio eznahikoa du kristalizazio prozesua burutzeko, baina ura tantatik lurruntzen doan heinean hauspeatzailearen kontzentrazioa handituz doa kristalizaziorako optimoa den kontzentrazioa lortu arte. Sistema orekan dagoenean, baldintza optimo hauek mantenduko dira kristalizazio prozesua amaitzen denerarte (Rhodes, 2006).

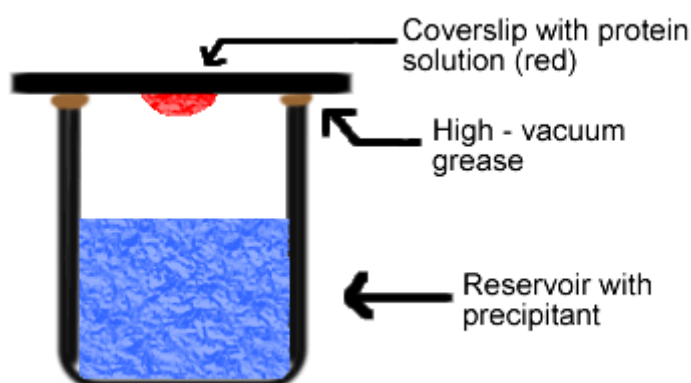


Figure 2.6 “Hanging drop” metodoaren diagrama.

<http://www.bio.davidson.edu/molecular/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>-tik hartutako irudia.

Gure kasuan, 1 µl proteina eta 1µl indargetzaile (0.1 M MES pH 6.5, 10% PEG 800, 0.2 M Zink azetato) erabili ditugu 500 µl indargetzaile duen ganbaran. Hutsa egiteko koipea gehitu diogu ganbararen inguruari eta ondoren plastiko batez tapatu, behin ondo itxita 21°C-tara inkubatu izan dira.

### 2.2.1.1.4 X-izpien difrakzio saiakerak

X-izpien kristalografia oso bereizmen handiko mikroskopia mota bat da. Proteinen egiturak maila atomikoan bistaratzeko baimentzen digu, proteinen funtzioen ezagumenduan lagunduz. Mikroskopia mota guztietan, xehetasun maila edo bereizmena mugatuta daude erabilitako

erradiazio elektro-magnetikoaren uhin-luzeragatik. Proteinak maila atomikoan ikusteko, 0.1 nm edo 1 Å uhin-luzera duen erradiazio elektro-magnetikoekin lan egin behar dugu, hau da, X-izpiak behar ditugu.

Molekula bakar baten difrakzioa oso ahula izango litzateke neurgarria izateko. Beraz, hiru-dimentsiotan ordenatutako molekulak, hau da, kristalak erabiltzen dira seinalea handitzeko. Proteina kristal txiki batek bilioi bat molekula izan ditzake. Kristalaren barne ordena ahula bada, X-izpiek ez dute angelu handi edo bereizmen handiarekin difraktatuko eta datu horiekin ezingo da bereizmen handiko egiturarik lortu. X-izpiek egituraren dauden elektroien difraktatzen dute eta ondorioz, X-izpi esperimentuen emaitza egituraren zeharrek elektroien banaketa mapa tridimentsionala da.

Behin kristalak ditugunean, X-izpien bidez aztertzeko garaia da. Kristala kapilare baten kokatu behar da eta ondoren, goniometroa deitzen den gailu batera gehitzen da, gailu honek kristala ondo kokatuta geratzea ahalbidetuko duelarik. Datu kriogenikoak biltzeko, nitrogeno gas hotzak kristala 100 K-tara mantenduko du esperimentu osoan zehar. X-izpiak "collimator" izena duen hodi estu batetik aterako dira eta ondo orientatutako kristala joko dute difrakzio-patroia lortzeko. X-izpien difrakzioa detektagailu batek jasoko du. Dena ondo joan ezker, puntu zorrotz garbiak ikusi beharko lirateke, puntu desberdinez osatutako sareta kristal bakarra dagoela adierazten duena, eta gatz edo izotz kristalaren presentziarik ez, puntu gogor edo eraztun moduan adierazten direnak. Kristala 4 Å-eko bereizmena izan beharko luke baldintza idealetan.

Kristalak era egokian difraktatzen badu, datuak jaso beharko genituzke. Lehenik kristalaren simetria, unitatearen parametroak, kristalaren orientazioa eta bereizmen mugak zehaztu behar dira. Informazio guzti hau izatean, datu bilketa estrategia bat garatu beharko litzateke bereizmena zein datuen betetasuna maximizatuko lituzkeena. Kristala angelu txikietan biratzen da, normalean gradu bat, eta X-izpien difrakzio patroia gordetzen da. Difrakzio patroia oso beteta dagoenean, biraketa angelua murriztu beharko lirateke puntu bakoitza irudian bereiz dadin. Prozesu hau errepikatu behar da gutxienez kristalak 30 graduetan zehar biratu duenerarte, baina batzuetan 180 graduko birak ere beharrezkoak izaten dira, kristalaren simetriaren arabera. Zenbat eta simetria txikiagoa izan, hainbat eta datu gehiago behar dira.

Saiakera hauek Bartzelonako Alba Sinkrotronean burutu ziren Kornelius Zeth doktoarearekin egindako kolaborazio baten bidez.

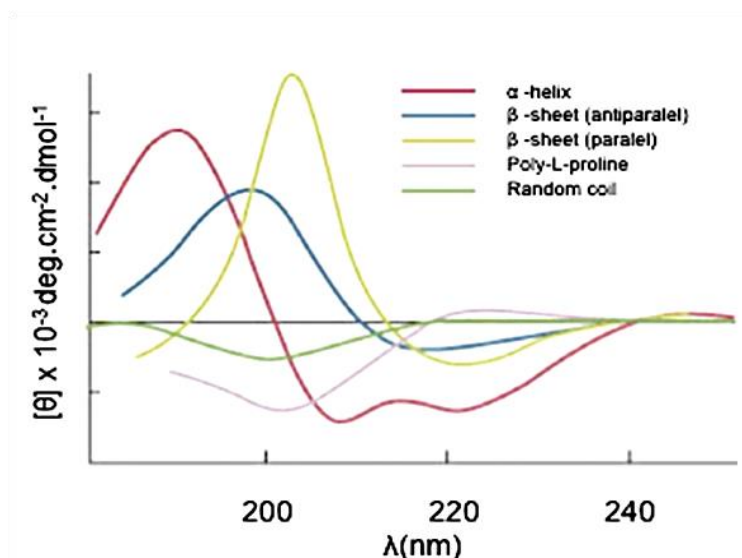
### **2.2.1.2 Dikroismo zirkularra**

Dikroismo zirkularra (DZ), bai soluzioan zein mintz-eredu sistemetan, egitura sekundarioa eta tertziarioan ematen diren egiturazko aldaketak behatzeko eta biomolekulen egonkortasun konformazionala determinatzeko erabili ohi den teknika da. Proteinen DZ espektroa ultramore

urrunean (far-UV) proteinaren egitura sekundarioa determinatzeko oso sentikorra da. Ultramore hurbileko espektroak (near-UV), aldiz, proteina eta peptidoen albo kate aromatikoek eta disulfuro zubien ekarpena adierazten dute DZan, analisia erraza da eta erabili behar den produktu kantitate oso txikia da. Hortaz, egituraren inguruko informazioa lortzeko teknika erabilienetakoa da. Hala ere, teknika honek ez digu proteinaren egitura tridimentsionala determinatzea baimentzen, horretarako, erresonantzia magnetiko nuklear (EMN) edota X-izpi tekniketara jo behar dugularik.

Dikroismo zirkularraren fenomenoak, ingurune asimetriko batean dauden bi kromoforo argi polarizatuarekin elkar-eragiten dutenean ematen da. Proteinaren kasuan, prozesu honetan parte hartzen duten lotura peptidikoek amida taldeak eta alboko kate aromatikoak talderik anitzenak dira. Amida taldeen  $n\pi$  eta  $\pi\pi^*$  trantsizioen kiralitatea eta hauen arteko elkarrekintza kirala, peptidoen kromoforoek aurkezten dituzten antolamendu espazialen menpe daude. Peptidoen kromoforoen alderdian (<240 nm), gainezarrita dauden  $n\pi^*$  eta  $\pi\pi^*$  espektroen bandengatik osaturik dago. Gainezarrita dauden  $n\pi^*$  eta  $\pi\pi^*$  espektroen banda hauek kate polipeptidikoaren zenbait alderdi konformazional edota konformeroren nahasketen emaitzak dira. Polipeptidoek eta proteinen kromoforoek antolamendu errepikakorra aurkezten dituzten konformazio lokalak dituzte. Antolamendu errepikakor hori  $\alpha$  helizeei eta  $\beta$  orriari dagozkie. Ordenazio ezberdinetan lotura peptidikoak hartzen duten orientazioen menpe, amida taldeen trantsizio optikoak, trantsizio anitzetan bana daitezke. Trantsizioen uhin luzerak ( $\lambda$ ) aldatu daitezke eta intentsitateak handitu edo gutxitu. Guzti honen ondorioz, egitura sekundarioko egiturek,  $\alpha$  helizeak,  $\beta$  orriak,  $\beta$  birak eta poli-L-prolina (P2), berezko DZ espektro bereziak dituzte (2.7 Irudia).

$\alpha$ -helize batek minimo bikoitz bat aurkezten du 222 nm eta 208-210 nm-tan eta maximo handi bat 191-193 nm-tan. Banda hauen intentsitateak, aztertzen diren peptido edo proteinen eliptikotasun proportzioa adierazten dute. DZ espektroa  $\beta$  egitura ezberdinen artean asko aldatu daiteke. Orokorrean,  $\beta$  orri konformazioek, minimo bakar bat aurkezten dute 210-225 nm-tan eta maximo bakar bat 190-200 nm-tan, hauen intentsitatea  $\alpha$  helizeei dagozkienak baino baxuagoak direlarik. P2 egiturazko elementua, 205 nm-tan banda negatibo handi bat izateagatik bereizten da. Azkenik, egitura desordenatuak, 200 nm-tik hurbil banda negatibo handi bat eta positiboak edo negatiboak izan daitezkeen zenbait banda ahul 220 nm eta 230 nm tartean izateagatik bereizten dira (2.7 irudia).



### 2.7 Irudia. Egitura sekundario ezberdinei dagozkien DZ espektroak.

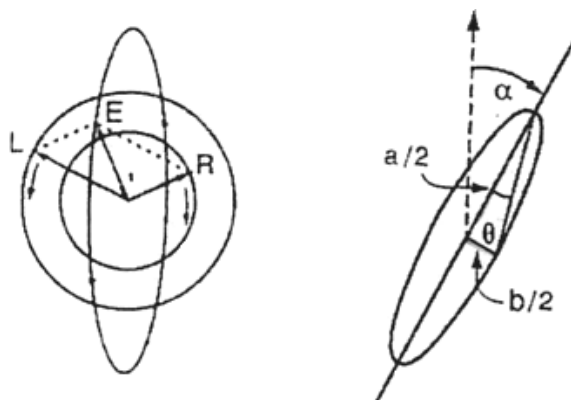
#### DZaren adierazpena

Linealki polarizatua dagoen argiak bi osagai ditu: (1) Ezkerretara zirkularki polarizatua dagoen osagaia (rpc) eta (2) eskuinetara zirkularki polarizatua dagoen osagaia (lpc). Rcp osagaiaren bektore elektrikoak, argi sortaren norantza daukan ardatz perpendikular baten inguruan birak ematen ditu, erloju baten ardatzen kontrako norantza hartuz. Lcp osagaia aldiz, erloju baten ardatzen norantza biratzen du. Konposatu kiral batek aktibitate optikoa aurkezten duenean, rcp-aren xurgapena eta lcp-aren xurgapena berdinak ez direlako da. Dikroismo zirkularra, argi polarizatuaren rcp eta lcp osagaien xurgapenaren ezberdintasuna bezala definitu daiteke. Lambert-Beer-en legea kontuan hartuz gero (UV-ikuskorra espektroskopiaren trantsizio elektronikoa definitzen duena), xurgapen ezberdintasun hauek hurrengo formularekin adieraz daitezke:

$$\Delta A = A_l - A_r = (\epsilon_l c l) - (\epsilon_r c l) = \Delta \epsilon c l$$

non,  $c$  solutu kiralaren kontzentrazio molarra den,  $\epsilon$  iraungipen molarraren koefizientea den eta  $l$  argiaren hari-neurria den;  $\Delta \epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$  izanik.

Argi polarizatuak ingurugiro kiral bat zeharkatzen duenean, bektore elektrikoek, ardatz nagusiarekiko biraketa angelu bat eratzen dagoen elipse bat deskribatzen dute. Osagai zirkularren bektore elektrikoek norantza berdina dutenean, beraien magnitudeen baturak elipsearen ardatz erdi-nagusia sortzen dute. Aurkako norantza dutenean berriz, beraien magnitudeen ezberdintasunak, elipsearen ardatz erdi-txikia sortzen dute. DZa ardatz erdi-nagusiaren eta erdi-txikiaren erlazioa bezala definitzen da. Erlazio hau, eliptikotasun bezala ezaguna den  $\theta$  angeluaren tangentea da (2.8 Irudia).



**2.8 Irudia. Eliptikoki polarizatu dagoen argia.** Eliptikotasun  $\theta$  angelua da, angelu honen tangentea elipsearen ardatz nagusia eta txikiaren arteko erlazioa izanik.  $\alpha$  angelua, elipsearen ardatz nagusiaren eta argiaren polarizazio planoaren arteko angelua da eta biraketa optikoa adierazten du.

Angelu hau orokorrean oso txikia denez,  $\theta$ -ren tangentea  $\theta$ -ren berdina da eta xurgapenarekin hurrengo adierazpenaren bidez erlazionatzen da:

$$\theta \text{ (deg)} = 32.98 \Delta A$$

Argiaren pasabidearen eta solutuaren kontzentrazio molarren arteko menpekotasun lineala kentzeko, eliptikotasun molarra hurrengo moduan definitzen da:

$$[\theta] = 100 \theta / c l$$

Lehenengo eta bigarren ekuazioak hirugarren ekuazioan ordezkatzuz hurrengo adierazpena lortzen da:

$$[\theta] = 3298 \Delta \epsilon$$

non, laginak azaltzen duen dikroismoaren magnitudea estintzio koefizienteen ezberdintasunaren menpe dagoen definitzen den.

Polipeptido eta proteinen DZan ostera, lotura peptidiko bakoitzeko eliptikotasun molarren adierazpena erabiltzen da. Lotura peptidiko bakoitzeko eliptikotasun molarra  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  unitateak ditu eta eliptikotasun molarra, peptidoak edo proteinak dituen  $n-1$  aminoazido hondarregatik zatitzerakoan lortzen da.

Aintzakotzat hartu daiteke, xurgapen elektronikoa eta dikroismo zirkularren espektroa zenbait bandaz osaturik daudela. Banda bakoitza oinarritzko egoera batetik elektronikoki kitzikatua dagoen egoera batera ematen den trantsizioari dagokio. Banda bakoitza zenbait parametroen bidez bereiz daiteke. Lehenengoa, uhin luzerak edo maiztasunak zehazten duten kokapenean oinarritzen da. Orokorrean  $\lambda_{\text{max}}$  edo  $\nu_{\text{max}}$  moduan adierazten da, eta DZaren xurgapenak balore

maximoa erdiesten duen uhin luzera edo maiztasuna dira. Bigarren parametroa intentsitatea da,  $\epsilon_{\max}$  modura adierazten dena xurgapenerako eta  $\Delta\epsilon_{\max}$  DZerako, eta muturreko banden baloreak direnak.

### 2.2.1.2.1 Egitura sekundarioaren determinazioa

Tesi lan honetan, bai soluzioan zein liposometan, BCL2 familiako proteina ezberdinen egitura aztertu da, baita DRP1 proteinarena ere. Alde batetik, arazketatik lortutako proteinak ondo tolestuta daudela ziurtatzeko eta bestalde, proteinen mintzerako batuketak egiturazko aldaketaren bat eragiten duten aztertzeke helburuekin erabili da. Erabilitako protokoloa jarraian deskribatzen da (7.Protokoloa).

#### **7.Protokoloa** Egitura sekundarioaren determinazioa

- 1- Laginen prestaketa: Proteinak (2.5-5  $\mu\text{M}$  inguru) liposomekin edo gabe Tris 10 mM indargetzaile batean, ordu batez inkubatzen dira. DZ neurketarekin hasi baino lehenago, laginak 10 minutuz uzten dira orekatu daitezen.
- 2- DZ neurriak: Neurketak Jasco J-810 dikroismo zirkularrerako espektropolarimetroan (Jasco Spectroscopic Co. Ltd., Hachioji hiria, Japonia) egin dira. Espektropolarimetroa tenperatura kontrolatzeko Peltier sistema bat (JASCO PTC-423S) darama eta azido (1S)-(+)-10-kamporsulfonikoarekin maiz kalibratzen da.
- 3- Neurketak burutzeko parametroak honakoak izan dira: 1 mm-ko pasu optikoa duen kuartozko kubeta, tenperatura 37°C, espektroaren uhin luzera tarte 190-260 eta 1 nm-ko pausuetan, 50 nm/min-ko abiadura, erantzun denbora 1 s, banda zabalera 2 nm, 100-eko sentikortasuna, espektro finala 20 espektroen batez bestekoa. Behin neurketak eginda, proteinaren espektroari liposomak duen edo gabeko indargetzailearen seinalea kentzen zaio.

(protokoloak hurrego orrialdean jarraitzen du)

- 4- Eliptikotasun molarraren kalkulua: Lambert-Beer-en legea kontuan hartuz, eliptikotasunaren graduak ( $\epsilon$ ) eliptikotasun molarrean  $[\theta]$  ( $\text{gradu}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) bihur daitezke:

$$[\theta] = \frac{\epsilon}{(10 \cdot l \cdot n \cdot c)}$$

non,  $c$  proteinaren kontzentrazio molarra den,  $n$  proteinaren lotura peptidikoen kopurua eta  $l$  kubetaren pasu optikoa cm-tan.

- 5- Egitura sekundarioaren balioespena: Ultramore urruneko DZ espektrotik egitura sekundarioa determinatzeko (Sreerama and Woody 2004) hainbat aurreratu-programa daude, kristalografikoki ebatzitako proteinen DZ espektroen datu-baseetan oinarritzen direnak. DZ espektroen azterketarako baliabide egoki bat CDPro online softwarea da; eta CONTILL, SELCON3 eta CDSSTR algoritmoak erabiltzen ditu.

#### 2.2.1.2.2 Proteinen egonkortasun termikoaren determinazioa

DZa proteinen egonkortasun termikoa aztertzeko ere teknika baliagarria da. Egiturari dagokion uhin luzera bereizgarri batera tenperaturaren eskaneatze bat egiten da. Gure kasuan, aztertu ditugun BCL2 familiako proteinak eta baita DRP1 proteina  $\alpha$ -helizedun proteina globularrak direnez, seinalea 222nm-tako uhin luzeran jarraian tenperaturarekiko neurtu izan da. Horrela, baldintza ezberdinetara zeuden proteinen kurbak konparatuz, liposomekin edo gabe, proteinen trantsizio tenperaturaren aldaketak aztertu ditzakegu.

Proteinen egonkortasun termikoa aztertzeko, lehendabizi, proteinak liposomekin edo gabe ordu batez 37°C-tan inkubatzen dira. DZ neurketak 222 nm-ko uhin luzerara, 25°C-tik 90°C-tara 1°C pausuetan egin dira. Trantsizio tenperatura DZ aparatuen softwarean dagoen kurbaren lehenengo deribatua kalkulatzeko duen baliabidea dela medio burutu da.

### 2.2.2 PROTEINA-LIPIDO ELKARREKINTZA: MINTZAREKIKO BATUKETA

“Embedded model” delakoak, BCL2 familiako proteinen arteko elkarrekintzetan mintzak zeregin kritikoa duela proposatzen du, DRP1en kasuan proteinak mintzarekin duen harremana ere garrantzitsua da fisio mitokondrialerako, beraz, proteina hauek mintzarekin elkar-eragiteko erabiltzen duten mekanismo molekular zehatza ezagutzea bere funtzio biologikoak guztiz ulertzeko ezinbestekoa da. Proteina batek mintz biologiko batekin elkarrekintza izateko duen

mekanismo molekularra ulertzeko: (i) mintzarekiko batze prozesuaren inguruko afinitate eta espezifitatearen inguruko informazio esperimentalak eta (ii) bigeruz lipidikoan proteinak duen topologia/konformazioa ezagutu behar dira.

X-izpi bidezko kristalografia edo elektroi bidezko kristalografia bezalako teknikak dira mintz proteinen egiturak bereizmen handiarekin lortzeko erabilienak. X-izpien kristalografiaren kasuan, lipidoek askotan ez dute kristalizazio prozesua jasaten eta kopurifikatu eta kristalizatzen lortzen badira ere, euren karakterizazioa baimentzeko behar besteko ordenarik ez dute izaten (Palsdottir & Hunte, 2004). Alternatiba moduan, elektroi kristalografia gero eta gehiago erabiltzen ari da mintz proteinen egiturak bereizmen atomikoan ebazteko (Raunser & Walz, 2009). Kristalik ez dagoenean, espektroskopia nuklear magnetikoa (NMR) (Aisenbrey *et al.*, 2013), Fourier-en Transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FT-IR) (Subirade *et al.*, 1995), edo Elektro-spinen Erresonantzia Paramagnetikoa (EPR) (Marsh, 2010) tekniken bidez proteina-lipido elkarrekintzen inguruko informazio baliagarria eskura daiteke. Mintz proteinak aztertzeko Dinamika Molekularren simulazioak ere erabili daitezke (Lindahl & Sansom, 2008). NMR edo X-izpietan oinarritutako teknikak ez bezala, proteinen eta lipidoen arteko elkarrekintza eta mugimenduak zehaztasun atomikoan monitorizatu daitezke denbora eta espazio bereizmen handiarekin. Adibide modura, 2012. urtean Contreras *eta lank.* Esfingolipido bakarra ezagutzen duen proteina baten transmintz domeinuaren azterketa molekularra burutzeko erabili zuten (Contreras *et al.*, 2012).

Arestian aipatutako bereizmen handiko teknikaz gain, proteinek mintzekin elkarrekintzen duten mekanismoak ikasteko beste saio fluorimetriko, zentrifugazio saio eta saio mikroskopiko batzuk ere badaude (Contreras *et al.*, 2012; Zhao & Lappalainen, 2012). Saio hauetako bakoitzak, informazio mota desberdina eskaintzen du eta muga tekniko espezifikoak ditu.

Besikulen sedimentazio eta liposomen flotazio saioak oso erabiliak dira proteinak lipidoarekiko duen afinitate eta espezifikotasuna aztertzeko (Landeta *et al.*, 2011; Yethon *et al.*, 2003). Sedimentazio saioa lipido besikula eta beraiekin elkar-eragiten duten proteinen sedimentazioan oinarritzen da, abiadura handiko zentrifugazio bat jasan ostean. Liposomen flotazio saioan aldiz, dentsitate gradiente baten zentrifugazioa ematen da. Orokorrean, lamela bakarreko zein lamela askoko besikula handiak mintz eredu sistemarik egokienak dira mota honetako azterketetarako. Bi metodoetatik, sedimentazioarena azkarragoa eta indargetzaile baldintza desberdinetarako erabilgarria da, gainera lipido eta proteina kantitate txikiagoak behar dira. Hala ere, mintzarekin elkarrekintzen duten proteina askok agregatzeko edo oligomerizatzeko joera izaten dute, liposomen absentsian sedimentatzea dakarrena. Egoera honetan, proteina hauen mintzarekiko elkarrekintza ezin da sedimentazio bidez era fidagarri batean aztertu eta flotazioa saioa erabiltzea gomendagarriagoa da.



Besikulen sedimentazio eta flotazio esperimentuetaz gain, badaude proteina batek mintzarekiko duen afinitatea neurtzeko erabili daitezkeen beste teknika batzuk, kalorimetria bidezko balorazio isotermikoa (ITC) (Ananthanarayanan *et al.*, 2003) eta gainazaleko plasmioen erresonantzia (SPR) besteak beste (Besenicar *et al.*, 2006; Bustillo-Zabalbeitia *et al.*, 2014; Landeta *et al.*, 2011). Liposomen batuketa saioetan ez bezala, teknika hauen bidez informazio kuantitatiboa lor daiteke. Hala ere, zenbait muga tekniko direla eta (ITC-ren kasuan oso proteina eta lipido kantitate handiak beharrezkoak dira eta SPR-aren kasuan, seinale inespezifikoak egon daitezke) gaur egun arte ez dira hain erabiliak izan proteina-lipido elkarrekintzak aztertzeko.

Tesi lan honetan zenbait BCL2 familiako proteinek eta DRP1ek zenbait lipidoekin batzeko duten ahalmena, sakarosa gradiente bidezko flotazio zentrifugazioa, lipido monogerezak, dot plapaketa eta gainazaleko plasmioen errezonantzia erabiliz analizatu dira. Faktore asko hartu behar dira kontutan proteina zehatz baten mintz elkarrekintzak aztertzeko orduan. Hurrengo faktore hauek, besteak beste: (i) Besikularen lipido konposaketa; (ii) proteina:lipido erlazioa; (iii) mintzaren kurbadura; (iv) esperimentuan erabilitako tanpoiaren pH eta gatz kontzentrazioak.

### 2.2.2.1 Dot plapaketa

Dot plapaketa (ingelesez, *Dot blot*) saiakuntzak lipidora batzen diren proteinen identifikazioa baimentzen du. Proteina ugarik fosfolipidoekin elkarrekintzak edukitzeko gaitasuna dute, eta normalean sekuentzian batuketa espezifiko bat burutzeko domeinuak dituzte, Pleckstrin-en homologia (PH) domeinua (Lemmon & Ferguson, 2000) adibidez. Hortaz, teknika honen bidez aztertzen ari garen proteinek lipidoak batzeko domeinuren bat duten edota lipido batekiko duten afinitate erlatiboa balioesteko erabilgarria da.

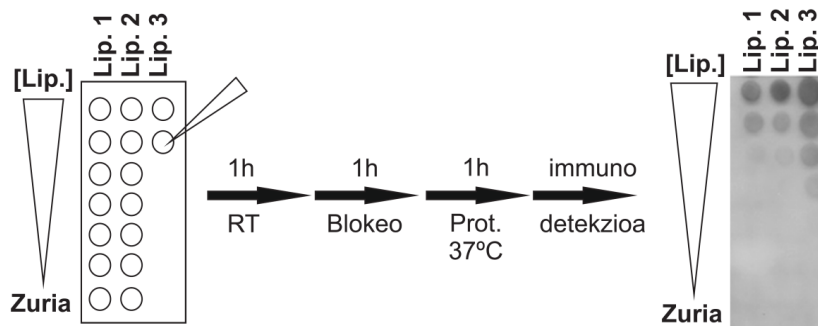
BCL2 proteinen artean, prozedura hau erabiliz, Basañez eta lankideek (Landeta *et al.*, 2011) BAKΔC proteinek zenbait lipido mitokondrialekiko duen batuketa espezifikotasuna aztertu zuten, berriki BAX proteinek hexadezenal lipidoarekiko duen batuketa argitu da teknika honen bidez (Chipuk *et al.*, 2012).

Tesi honetan, komertzialki erabilgarri dauden *Membrane Lipid strips* izeneko mintzak (Echelon Bioscience, Salt Lake hiria, UT, EEBB) edo eskuz prestatuturiko mintzak erabili ditugu. BOK eta DRP1 proteinek lipidoak ezagutarazteko ezaugarriak aztertzen duen protokolo zehatz bat deskribatzen da jarraian (8. Protokoloa).

### **8.Protokoloa** *Dot plapaketa*

- 1- Lipido-mintzen prestaketa: Lipidoak metanol:kloroformo:ura 2:1:0.8 soluzioan ondoz-ondoko diluzioak eginez, kontzentrazio ezberdineko stockak prestatzen dira, kontzentrazioak 0-10 mM tartean egonik. Ondoren, diluzio bakoitzetik 1 µL-ko tanto bat *Hybond-C extra* mintzean (Amersham, GE Healthcare, Waukesha, WI, EEBC) jartzen dira eta mintza ordu batez giro tenperaturan sikatzen uzten da.
- 2- Proteina eta lipidodun mintzaren arteko inkubazio prozedura:
  - Blokeoa: Mintza %1 esne gaingabetua duen PBS indargetailearekin ordu batez, giro tenperaturan, irabiagailu orbital batean inkubatzen da.
  - Proteinaren inkubazioa: 25 nM proteina eta mintza PBS indargetzailean, ordu batez, 37°C-tan eta irabiagailu orbital baten inkubatzen dira.
  - Immunodetekzioa: PBStan 10 minutuko hiru garbiketa egin ostean, lipidora batutako proteina Western plapaketa bezalako prozedura jarraituz detektatzen da. Lehendabizi, antigorputz primarioarekin (1:2000 diluzioa) inkubatzen da, ordu batez giro tenperaturan. Bigarrenez, PBSarekin deskribatutako beste garbiketa txanda bat egin ondoren, mintza HRP duen antigorputz sekundarioarekin (1:10000) inkubatzen da, ordu batez giro tenperaturan. Azkenik, proteina ECL-Plus Western plapaketarako erreaktibo kimilumiszentetarekin (Pierce, Rockford, IL, EEBC) eta *Hyperfilm™ ECL™* filmekin (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, EEBC) detektatzen da. Behin negatiboak digitalizatu direnean, seinaleen dentsitate integratuak *Quantity One software* (Fujifilm USA, Valhalla, NY, EEBC) erabiliz ebaluatzen dira.

Dot plapaketa metodoaren abantailen artean honakoak daude: proteina kantitate gutxi baten beharra eta saio berdinean lipido ezberdinen azterketaren aukera. Honenbestez, proteina eta lipido elkarrekintzak aztertzeko saiakuntza merkea eta azkarra da. Metodo honen emaitzak kualitatiboak eta afinitate erlatiboak kalkulatzeko erabili daitezke, adibidez, proteina berak lipido ezberdinekiko dituen afinitateak konparatzeko. Aitzitik, asoziazio konstante kuantitatiboak lortzeko, gainazaleko plasmoin erresonantzia (SPR, ingelesetik *Surface Plasmon Resonance*) edo kalorimetria bidezko balorazio isotermikoa (ITC, ingelesetik *Isothermal Titration Calorimetry*) teknikak erabili behar dira.



**2.9 Irudia. Dot plakaketa saioaren eskema.** Aztertu nahi diren kontzentrazio ezberdineko lipidoen tantak nitrozululosazko mintzera gaineratzen dira. Giro tenperaturan beste ordu batez sikatzen utzi ostean, mintza ordu batez blokeatu eta azterketaren helburu den proteinarekin inkubatzen da. Azkenik, nitrozululosazko mintzera batutako proteina immunodetekzio bidez aztertzen da.

### 2.2.2.2 Gainazaleko plasmoin erresonantzia

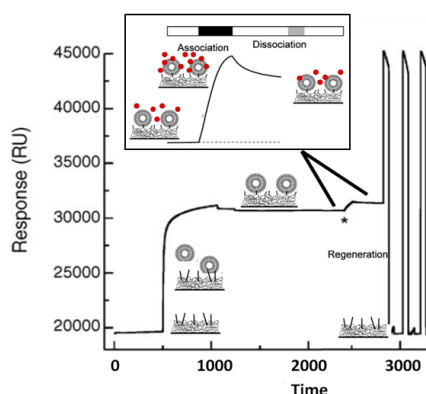
Gainazaleko plasmoin erresonantzia (SPR, ingelesetik *Surface Plasmon Resonance*) makromolekulen elkarrekintzak aztertzeko teknika garrantzitsuenetariko batean bilakatu da. Nahiz eta biokimikaren arloan, SPR proteina-proteina arteko interakzioak ikasteko erabili izan ohi den, lipido sentzore espezifikoak diren txipen garapenak mintz eta proteina arteko elkarrekintzak aztertzea ahalbidetu du. Txip hauetan inobilizatutako mintzen lipido konposaketa moldatuz, mintz eta proteinen arteko interakzioak modu erraz batean ikertu daitezke. Honez gain, SPR teknikak makromolekulen elkarrekintza ahulak analizatzeko hainbat abantaila aurkezten ditu, beste tekniken bidez ezinezkoak diren neurketa desberdinak ahalbidetuz (Besenicar *et al.*, 2006; van der Merwe & Barclay, 1996; Van der Merwe & Barclay, 1994). Tesi lan honetan, SPR teknika DRP1 proteinak lipidoetara batzeko daukan espezifikotasuna aztertzeko erabilia izan da.

Saio hauek burutzeko *Biacore* sistema erabili da. Biomolekulen elkarrekintzak aztertzeko helburuarekin, ligando deituriko sustantzia bat (liposomak) urrezko geruza mehe batez estalitako beirazko porta bat diren sentzore txipeko gainazalean atxikiko da. Laser baten argi polarizatua errefrakzio-indize handiko ingurune (normalean prisma bat) batean zehar, errefrakzio-indize txikiko ingurune baten ertzean dagoen urrezko geruza meherantza zuzenduko da; ondorioz, urrezko geruzaren gainazalean, argiaren eraso-angelu kritiko zehatz batera gainazaleko plasmoiak eratuko dira. Honek argia absorbatuko du eta isladatutako argiaren intentsitatearen beherapen bat bezala jasoko da. Angelu kritikoa gainazaletik gertu dagoen (100nm inguru) inguruneko errefrakzio-indizearen menpekota da, eta gainazal horretara batzen diren analitoek (proteina) angeluaren balioa hau aldatzeko ahalmena izango dute. Honela, analito eta ligandoen arteko interakzioak gertatzen baldin badira, txiparen gainazalaren

errefrakzio-indizea aldatu egingo da, eta hau seinalearen handipen batean ondorioztatu. *Biacore* sistemak erresonantzia unitateak (RU) seinalearen handipen bat deskribatzeko erabiltzen ditu, angelu kritikoaren  $10^{-4}$  graduen aldaketara berdintzen direnak. RU balioen emaitzak denboraren funtziopean irudikatzen dira, sentsograma izeneko grafika bat lortuz (Besenicar *et al.*, 2006). Erabilitako fase mugikorraren eta proteina duen indargetzaileen arteko errefrakzio-indizeen ezberdintasunetik, atzeko-planoko erantzunak sortu daitezke; hortaz, seinale hau sentsogramatik kendu beharko da proteina batuketari dagokion seinalea soilik duen sentsograma lortzeko. Honez gain, seinalearen RU eta sentsore txiparen gainazalean dagoen materiaren masaren artean erlazio lineal bat dago,  $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$  (Stenberg *et al.*, 1991). Honenbestez, SPR teknikak sentsore txiparen gainazaleko masaren kontzentrazioa neurtu dezakenez, molekulak fluoreszenteki edo erradioaktiboki markatzearen beharrik gabe bi molekulen arteko batuketa zuzenean detektatzeko ahalmena izango du.

Sentsograma batean bi prozesu desberdin banatu daitezke: asoziazio fasea, proteina injektatzen den tarte, eta disoziazio fasea, proteina injektatzez bukatu osteko epea. Asoziazio fasean, aldibereko proteinaren asoziazio eta disoziazio prozesu desberdinak emango dira, beraz, oreka asoziazio eta disoziazio tasak berdintzen direnean lortuko da. Esan beharra dago, baldintza eredarriren menpeko saio batean disoziazioa soilik disoziazio fasean gertatuko den arren, errealitatean berbatuketa eskuarki gertatu ohi den prozesua dela.

Lan honetan, L1 sentsore txipa (BIAcore, GE Healthcare, Waukesha, WI, EEBB) erabili zen. Sentsore txip honek liposomen atxikipenerako gainazal egokia sortzen duen karboximetilatutako dextrano batzuei kobalenteki lotuta dauden talde lipofilikoak ditu. Liposoma hauek beraien lipido geruza bikoitzaren egitura mantentzen dutela ikusia izan da (2.10 Irudia).



**2.10 Irudia.** SPR saio baten sentsogramaren abidibea. Lehendabizi, liposomak sentsore txipean zehar pasarazten dira eta atxikituta geratzen dira. Honen ondorioz, seinalearen (RU) handipen bat ematen da eta sentsograman erregistratzen da. Ondoren, aztertu beharreko proteina liposomak batuta dituen txipean zehar pasaraziko da. Proteinak liposomekin interakzioen bat badauka, batuketa fasea

deitutako seinalearen handipen bat erregistratuko litzateke. Behin oreka lortu denean, banaketa fasea, proteinak liposometatik askatuko dira,. Bukatzeko, sentsore txipa lehenera ekartzen da detergente bat erabiliz, adibidez, oktyl  $\beta$ -Dglukopirasonidoa.

SPR saioetarako, BIAcore<sup>TM</sup>3000 tresna erabili izan zen jarraian xehatutako protokoloa erabiliz (9.Protokoloa).

### **9.Protokoloa**      *SPR neurketak*

- 1- L1-txiparen prestakuntza: gainazalaren gainean 100  $\mu$ l/min-ko fluxu batekin 30 segundoz, 40 mM oktyl  $\beta$ -Dglukopiranosidoa (Sigma) txertatzen da. Ondoren, lipido konposaketa zehatzeko liposomak (2mMeko kontzentrazioa) txertatzen dira 3 minutuz eta 2  $\mu$ l/min-ko fluxuarekin. Hortaz, liposomak sentsore txiparen gainazalera atxikitzen dira, liposomen egitura mantenduz.
- 2- Batuketa saioa: Analisia 37°C-tan egiten da eta fase mugikorraren indargetzailea KHE izan da. Fase mugikorrean disolbatutako proteina lagina liposomaz estalitako txipean zehar txertatzen dira, 10  $\mu$ l/min-ko fluxuarekin, eta seinalearen aldaketak erregistratzen dira denboran zehar.
- 3- Banaketa fasea: Proteina txipetik askatzean, seinalearen beherapen bat ikusi daiteke sentsograman.
- 4- L1 txiparen birsortzea: 20 mM CHAPS eta %0.4 SDS detergentearen 2 minutuko pultsu bat eta fase mugikorraren beste 2 minutuko pultsu bat txertatuz, liposomak L1 txipetik askatzea lortu da.

### **2.2.2.3 Sakarosa gradiente bidezko flotazio zentrifugazioa**

Mintzean ikusgai den efektu bat izateko, lehendabizi proteina mintzera batu beharko da. Proteina eta lipidoen arteko elkarrekintza ikusteko metodo arrunt bat liposometarako batuketa aztertzea da. Metodo hau burutzeko erabili ohi diren protokolotan hainbat pausu daude: (i) proteina eta liposomen arteko inkubazioa, eta (ii) liposometara batutako proteina eta batu ez denaren frakzioen bereizketa. Jarraian azaltzen da protokolo zehatza (10.Protokoloa).

### **10.Protokoloa** *Sakarosa gradiente bidezko flotazio zentrifugazioa*

- 1- Sakarosa gradientearen prestaketa: Behin liposomak eta proteinak inkubatzen direnean, sakarosa dentsitate gradiente eten bat (1 ml) prestatzen da: beheko frakzioa (1.4 Meko sakarosa azken kontzentrazioa), erdiko frakzioa (0.8 Meko sakarosa) eta goiko frakzioa (0.5 Meko sakarosa).
- 2- Zentrifugazio prozedura: Zentrifugazioa (100,000 rpm, 3h, 4°C-tan) *Beckman Optima TLX Benchtop* ultrazentrifugagailu baten (Beckman Coulter Miami, FL, EEBB) eta TLA 120.2 errotorearekin burutzen da. Zentrifugazioan zehar, liposomek edo proteinadun liposomek goiko frakziora flotatzen dute, eta proteina askea, berriz, dentsitate handiena zuen frakzioan geratzen da (beheko frakzioa). Behin zentrifugazioa burututa, gradienteak 4 frakziotan banatzen da: goiko bi frakzioek (1-2 izendatuak) liposomak dituzte (liposoma proteinekin edo gabe) eta beheko bi frakzioetan (3-4 izendatuak) liposometara batu ez den proteina dago.
- 3- Proteinen detekzioa: Frakzio bakoitzetik alikuota baliokideak hartzen dira eta western plapaketa bidez edo fluoreszentiaren bistaratzearen bidez, frakzio bakoitzeko proteina kantitatea zehazten da.

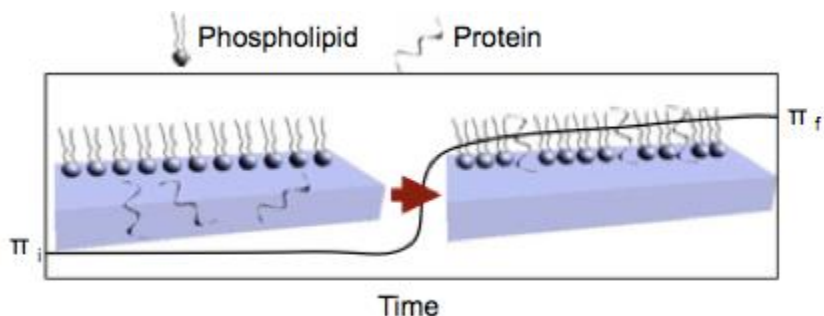
#### **2.2.2.4. Lipido monogeruzak**

Metodo fluorimetrikoetatik gain, lipido monogeruzak proteina bat mintzarekiko duen afinitatea aztertzeko ere erabili daitezke. Beraien homogeneitate, egonkortasun eta bere geometria planarra dela eta, modelo paregabea da, adibidez mintzaren segregazio faseak aztertzeko.

Mintza deformatzen duten proteinak aztertzeko ere erabili izan da berriki elektroik mikroskopiarekin elkartuz (Ford *et al.*, 2002).

Lipido monogeruza esperimentuetan, lipido dentsitate bidimentsionala monogeruza estutuz kontrola daiteke, horrek zenbait saio biokimiko zehatzetarako abantailak eskaintzen dituelarik. Area konstante mantenduz aldiz, lan honetan erabili den metodoan, azalera presioan emandako handipena peptido edo proteina monogeruzan barneratu dela esan nahi du eta proteina:lipido

elkarrekintzen inguruko informazio baliotsua ematen digu (Brockman, 1999; Maget-Dana, 1999).



**2.11 Irudia. Lipido monogerruzaren batean ematen ari den proteina baten barneraketa prozesuaren irudi eskematikoa.** Monogerruzaren hasiera presioa nahi den baliora doitzen da ( $\pi_i$ ). Proteina monogerruzaren barneratzen da azalera presioa handituz, orekara iritsi arte ( $\pi_f$ ).  $\Delta\pi$  hurrengo ekuazioa erabiliz kalkula daiteke  $\Delta\pi = \pi_f - \pi_i$ .

Lan honetan, monogerruzaren azalera presioa ( $\pi$ ) 37°C-tan neurtu da MicroTrough-S system (Helsinki, Finland) erabiliz, irabiatze konstante pean. Langmuir balantza kalibratu ostean, lipido nahasketaren (Stock kontzentrazioa 1 mM, kloroformotan) bolumen txiki bat 1.25 ml KHE indargetzailearen (fase urtsua) gainean jarri da, hasierako azalerako presio zehatz bat duen monogerruzaren batean eratuz ( $\pi_0$ ). Behin monogerruzaren azalera presioa orekatu denean, proteina kantitate bat zulo baten bidez fase urtsuan txertatzen da, eta azalerako presioaren aldaketa ( $\Delta\pi$ ) neurtzen da denboraren funtziopean.

Proteina batek monogerruzaren batean txertatzeko ahalmena aztertzeko oso parametro erabilgarria presio kritikoa da ( $\pi_c$ ), hau da,  $\Delta\pi$  zero bihurtzen deneko  $\pi_i$  balioa. Mintz zelularrek 30 mN/m inguruko azalera presioa dutela proposatu da (Janmey & Kinnunen, 2006). Dena dela, balio hau eztabaidagarria da eta asko alda daiteke.

Tesi honetan jarraitutako prozedura hurrengo protokoloan zehazki azalduta agertzen da (11.Protokoloa).

### **11.Protokoloa Lipido monogeruzak**

- 1- Monogeruzen prestaketa: Langmuir balantza kalibratu ostean, lipido nahasketaren (Stock kontzentrazioa 1 mM, kloroformotan) bolumen txiki bat 1.25 ml KHE indargetzailearen (fase urtsua) gainean jartzen da, hasierako azalerako presio zehatz bat duen monogeruza bat eratuz ( $\pi_0$ ).
- 2- Proteinaren txertaketa eta azalerako presioaren neurketa: Behin monogeruzaren azalera presioa orekatzen denean, proteina kantitate bat zulo baten bidez fase urtsuan txertatu, eta azalerako presioaren aldaketa ( $\Delta\pi$ ) neurtzen da denboraren funtziopean .

Oharra: Garrantzitsua da azpimarratzea proteinek aire/ur interfasean mugitu daitezkeela, gainazal presioan handipen bat sortuz. Beraz, lehenik eta behin lipido monogeruzaren absentsian gainazal presioa konstante deneko proteina kontzentrazio minimoa zein den zehaztu beharko dugu. Honek adieraziko digu zein hasierako gainazal presiotik aurrera neurtzen has gaitzeken lipido monogeruzaren presentzian.

## **2.2.3 MINTZ IRAGAZKORTZE ETA LIPIDO NAHASKETA SAIOAK**

### **2.2.3.1 GUVen iragazkortze saioa**

GUVak mintz-eredu oso erabilgarriak dira mintzen iragazkortze prozesuak aztertzeko (Ambroggio *et al.*, 2005; Ambroggio *et al.*, 2005). LUVen iragazkortze esperimentuekin alderatuz, besikula bakarreko saioek besikula jakin bakoitzaren betetze maila eta egonkortasuna aztertzea baimentzen dute, baita besikula populazioaren betetze mailen banaketaren analisi kuantitatiboa ere (Apellaniz *et al.*, 2010; Bleicken *et al.*, 2013). Besikula bakarrean ematen den zunda desberdinen barneraketaren ikasketak peptido zein proteinen poro eraketaren mekanismoa sakontasun handiagoz ulertzeko tresna baliotsua da (Apellaniz *et al.*, 2010; Bleicken *et al.*, 2013; Fuertes *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008; Schön *et al.*, 2008; Tamba & Yamazaki, 2009). Sistema biologikoak intrinsikoki heterogeneoak direla kontutan hartuz, metodo honek besikula bakar mailan poro eraketaren mekanismoa aztertzeko aukera eskaintzen du, LUVak erabiliz egiten diren esperimentu gehienekin ez bezala, zeinetan lortutako informazioa populazio osoaren batazbesteko balioa den.



Lan honetan, GUVak erabili ditugu BOKΔC6His-ren iragazkortze ahalmena ikusi eta iragazkortze prozesu honetan zehar lipido desberdinek izan dezaketen papera aztertzeko.

GUVen iragazkortze esperimentuen prozedura jarraian azaltzen da (12.Protokoloa).

**12.Protokoloa**      *GUVen iragazkortze saioa*

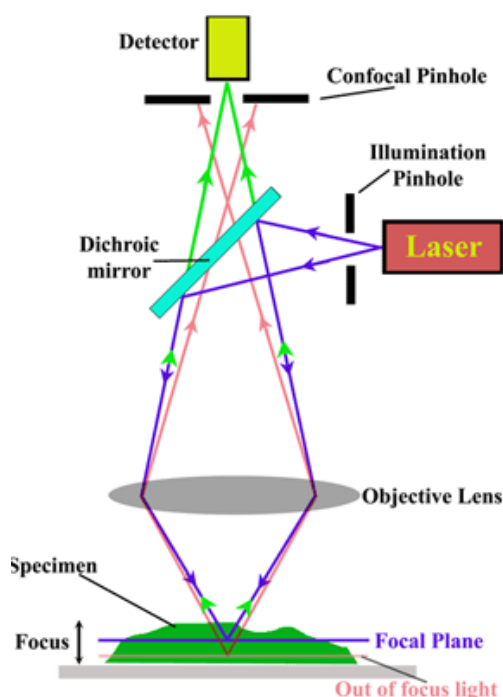
- 1- GUVen prestakuntza: GUVak 4.protokoloan deskribatutako prozedura jarraituz elektroformatzen dira, saio hauetan mintza fluoreszenteki Dil mintzeko zundarekin markatuz.
- 2- Laginen prestakuntza: Lehendabizi, 4. Protokoloan azaldu den moduan, behaketa-ganberak 10 mg/mL gantz-azido gabeko BSA (Sigma Aldrich) blokeo soluzioarekin 30 minutuz inkubatzen dira, ondoren, Milli-Q urarekin garbituz. GUVen prestakuntzarako erabilitako sakarosa soluzioaren osmolaritate antzekoa duen soluzio indargetzailearen 340 µl jartzen dira ganberako putzu batean. Honi, azertu behar diren BCL2 proteinak eta saioan erabiliko diren zundak gehitzen zaizkio. Zunda markatzaileen bi konbinazio erabili izan dira: Alokofozianina (APC) (250 nM) eta Alexa-647 (250 nM). Osagai gutziak ondo nahasten dira eta hauei GUV elektroformatuen 80 µL gaineratzen zaizkie behaketa ganberara (Oharra: GUVak gaineratzerakoan pipetan erabiliko den puntaren bukaera moztu behar da GUVen apurketa ekiditzeko). Inkubazio baldintzak 2 ordukoak izan dira.
- 3- Neurketak: Behaketa-ganbera mikroskopia konfokalean jartzen da eta neurketak 25°C-tan egin dira. Irudien analisisa ImageJ programarekin burutu da.

Jarraian fluoreszentiako mikroskopia konfokalaren oinarrien deskribapen laburra (Smith, 2006).

Fluoreszentiako mikroskopia arrunt batean (ad. Wide-field), erradiazio elektromagnetikoak lagin guztia era berean irradiatzen du eta fluoreszentzia mikroskopiaoren fotodetektore edo kamarak jasotzen du. Mikroskopia konfokalean aldiz, foku-kanpoko seinalea deusestatzen da eta bakarrik laginaren plano fokal estu bakarretik datorren fluoreszentzia iritsiko da detektagailura. Horren ondorioz, irudien bereizmen optikoa hobea da mikroskopia konfokalean. Hala ere, laginaren fluoreszentiaren parte handi bat detektagailuko arraildurak blokeatzen

duenez, bereizmen handi honek intentsitatearen gutxipena suposatzen du, beraz askotan esposaketa luzeak beharrezkoak izaten dira.

Molekula fluoreszenteak kitzikatzen eta igorritako fluoreszentzia mikroskopioaren objektiboak jasotzen du eta honek ispilu dikroikotik arraildurara zuzentzen du. Arraildurak fotodetektagailura iritsiko den igorritako fluoreszentzia hautatzen du. Plano fokaleko fluoreszentziak arraildura zeharkatuko du, baina plano fokaletik at dagoen fluorestzentzia blokeatuko da. Laginaren 3D-ko irudia eratzeko ispilu bereziak erabiltzen dira, laser sortak x-y planoan eskaneatu dezan, horrela Laser scanning Confocal Microscope (LCSM) moduan ezaguna den mikroskopio berezia eraikitzen da.



**2.13 Irudia. Mikroskopio konfokal baten irudikapen eskematikoa.** Mikroskopio konfokalak argiztapen puntuala eta arraildura bat, fokapen gunetik kanpo dagoen argia deusestatzeko erabiltzen du. Ondorioz, irudien bereizmen optikoa askoz handiagoa da epifluoreszentziako mikroskopioekin alderatuta. [<http://www.jic.ac.uk/microscopy/more-tik-hartua>].

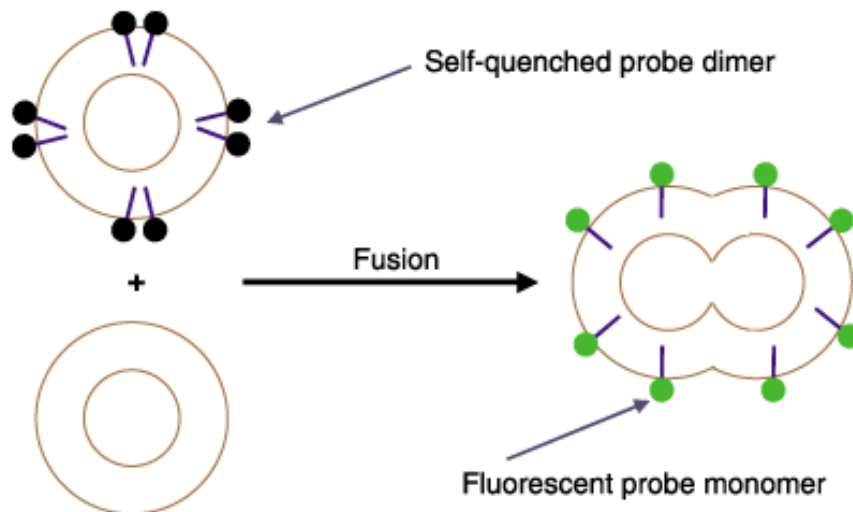
Lan honetan, LCSM erabili da GUVen esperimentuen bistartzeko. GUVak alderantzizko fluoreszentzia mikroskopio konfokal (Nikon DECLIPSE C1, Nikon Inc., Melville, N.Y.) batean begiratu, 60x TIRF olio objektibo batekin. Irudiak ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) softwarearekin prozesatu izan dira eta besikula bakoitzaren betetze gradua hurrengo ekuazioa erabilia kalkulatu da:

$$\% \text{ Leakage} = [(F_{t \text{ in}} - F_0) / (F_{t \text{ out}} - F_0)] \times 100$$

Non, **Ft in** eta **Ft out** t denboran lortutako batzbesteko fluoreszentzia intentsitateak diren GUV barruan eta kanpoan, hurrenez hurren, eta **F0** hondo-zarata baitiren

### 2.2.3.2 Lipido nahasketa esperimentuak

Mintz biologian, fusio prozesua horrela definienezake: Hasierako bi lipido bigeruzak desberdinek euren gune hidrofobikoak batzeko prozesua da. Bi bigeruzen lamela biak batu ezkerre, zubi urtsu bat sortuko da, bi egituren barne edukiak nahastu daitezke. Bigeruzak bakoitzeko lamela bakar batzen bada aldiz, bigeruzak hemifusionatuta daudela esango genuke. Hemifusioan, kanpo mintzeko osagai lipidikoak nahastu daitezke, baina barne mintzak aldatu gabe mantenduko dira. Bigeruzak bakoitzaren barne edukiak ere banatuta mantenduko dira. Beraz, bi fusio maila daudela esan genezake: mintz lipidoen nahasketa eta barne edukien nahasketa. Struck eta lankideen (1981) erresonantzia bidezko energia transferentzia saioa erabili da mintzean emandako lipido nahasketa neurtzeko. Metodo honetan, NBD (emaile) eta Rodamina (hartzaile) zundaz markatutako mintzak, markatu gabeko mintzekin konbinatuko dira. NBD eta Rodamina distantzia jakin batera daudenean, "Förster resonance energy transfer (FRET)" delakoa gertatuko da. Fusioa eman ostean, FRET gutxituko da bi zunden arteko distantzia handitzen delarik, beraz NBDren fluoreszentzia handituko da. NBDren fluoreszentziaren handipen hori da guk neurtuko duguna (2.14 irudia). Saio hauek egiteko jarraitutako protokoloa jarraian azalduta agertzen da (13. Protokoloa).



**2.14 irudia. Lipido-nahasketa saiakera baten adierazpena.** lifetechnologies.com. web orritik lortutako irudia.

### **13.Protokoloa**      *Lipido-nahasketa saioa*

- 1- Liposomen prestaketa: CL, PC/PE/CL (50:20:30) PC/PE (80:20) eta PC/PE/PG (30:20:60) LUVak prestatuko dira 2.Protokoloa jarraituz. Hiru populazio desberdin prestatzen dira lipido konposaketa bakoitzeko, markatu gabeko liposomak, 2 mol% NBD-PE eta 2 mol% Rh-PE duten liposomak, eta %0.2 NBD-PE eta Rh-PE duten liposomak. Markatutako liposomak markatu gabeko 9 aldiz kantitate handiagoan dauden LUVekin nahasten dira
- 2- NBD-PE emisio neurketa: NBD-PE emisioa 530 nm-tara neurtzen da eta kitzikatze uhin luzera 465 nm-tara ezartzen da, (slits, 4 nm). 515 nm-ko filtroa lagina eta emisio monokromadorearen artean ipintzen da dispertsio interferentziarik gerta ez dadin.

#### **2.2.3.3 Argi dinamikoaren dispertsio esperimentuak**

Besikulen tamainaren neurketak argi dinamikoaren dispertsioa erabiliz egin dira. Teknika honek, soluzioan dauden partikulen mugimendu Brownianoa dela eta, dispertsatutako argiaren intentsitatean ematen diren fluktuazioak neurtzen ditu. Datu hauetatik, partikulen difusio koefizienteak kalkula daitezke, eta hauxe besikularen erradio hidrodinamikoarekin ( $R_H$ ) erlazionatu daiteke Stokes-Einstein ekuazioaren bitartez.

Neurketarako, lipido nahasketa saioetan aztertutako lagin berak erabili ditugu. Laginak Malvern Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern, Instruments, UK) aparatuan neurtu dira, kubeta akriliko estandarrak erabiliz eta 5mW ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ )-eko He-Ne laser sorta bat erabiliz. Laginak dispertsatutako argia, laser sortarekiko perpendikularki kokatuta dagoen fotomultiplikatzaile batek detektatzen du.

#### **2.2.3.4 Krio-finkapenean oinarritutako mikroskopia elektronikoa**

Krio-finkapenean oinarrituriko mikroskopia elektronikoa (Cryo-EM, ingelesetik *Cryo-electron microscopy*) igorpen elektroik mikroskopiaren (EM) aldaera bat da, zeinetan lagina tenperatura kriogenikoetara (orokorrean nitrogeno likidoa) aztertzen den. Cryo-EM, tindatu gabeko laginak berauen ingurugiroan aztertzea ahalbidetzen duenez egiturazko biologian arrakasta handia duen teknika da.

Mikroskopia elektronikoko teknika honetan, laginen prestaketaren lehen pausua krio-finkapen metodoa da, non laginak ingurune urtsu batean fixatzen baitiren. Laginak izotz amorfoan sartzen

dira eta beirztapen prozesu honek guztiz hidratatutako makromolekulen egiturak irudikatzea baimentzen du. Metodo honek, izozketa ultra-azkar bat eragiten du, laginean era daitezkeen kristalen eraketa eragotziz. Ondoren, azeleratutako elektroien tentsio sorta bat lagin ultra estu batean zehar igortzen da hutsean, honek, igarotzen den bitartean laginarekin interakzionatzen duelarik. Elkarrekintza hauetatik irudi bat sortzen da: irudi hau handitzen eta enfokatzen da lente magnetiko batzuetatik irudikapen tresna batera (karga akoplatuko gailua) seinalea transmitituz. Erabilitako protokoloa jarraian azaltzen da (14. Protokoloa).

#### **14.Protokoloa**      *Crio-EM saioa*

- 1- Laginen prestaketa: Aztertu beharreko BOKΔC6His, MCL1ΔC eta BAK/cBID proteinak lipido konposaketa ezberdinetako LUVekin eta lipido:proteina ratio ezberdinetara inkubatzen dira, 37°C-tan eta 15 minutuz.
- 2- Beirztapen prozedura: Laginaren mikrolitro batzuk *Vitrobot* izeneko tresna (tenperatura eta hezetasun mailak konstanteak mantentzeko erabiltzen dena) baten barruan dagoen kuprezko sareta batera gaineratzen dira (Bellare *et al.*, 1988; Frederik & Hubert, 2005). Sareta hau erabili aurretik, karbonoarekin estaltzen da azalera hidrofiliiko bat izan dezan. Beirztapena burutzeko, lagina duen sareta hoztutako etano likidoan murgiltzen da, modu honetan laginaren geruza fin bat lortzen delarik ( $\approx 100$  nm).
- 3- Irudien kaptura: Sareta *Field Emission Gun* duen JEM-2200FS/CR igorpen mikroskopioan (*JEOL Europe*, Croissy-sur-Seine, Frantzia) jartzen da eta 200Kv eta nitrogeno likidoaren tenperaturan burutzen dira neurketak. *In-column omega* energia iragazkia irudiak erregistratzeko seinale/zarata ratioa hobetzeko erabili da. Digitalizatutako irudiak *UltraScan4000 CCD* kamera erabiliz erregistratu dira, 55.058 handipena erabiliz 2.7 Å/pixel erresoluzioa lortzeko.

### **2.2.3.5 Transmisio elektroik mikroskopia**

Transmisio elektroik mikroskopia (TEM) mikroskopia teknika bat da, zeinetan elektroien sorta bat lagin ultra-mehe batean zehar transmititzen den, laginarekin elkarri eragiten duelarik. Laginetik pasatutako elektroiek laginarekin elkarreragitean irudi bat sortzen da. Tesi honetan, TEM erabili da BOKΔC6His proteinak besikula lipidikoetan sortutako mintz eraldaketak ikusteko.

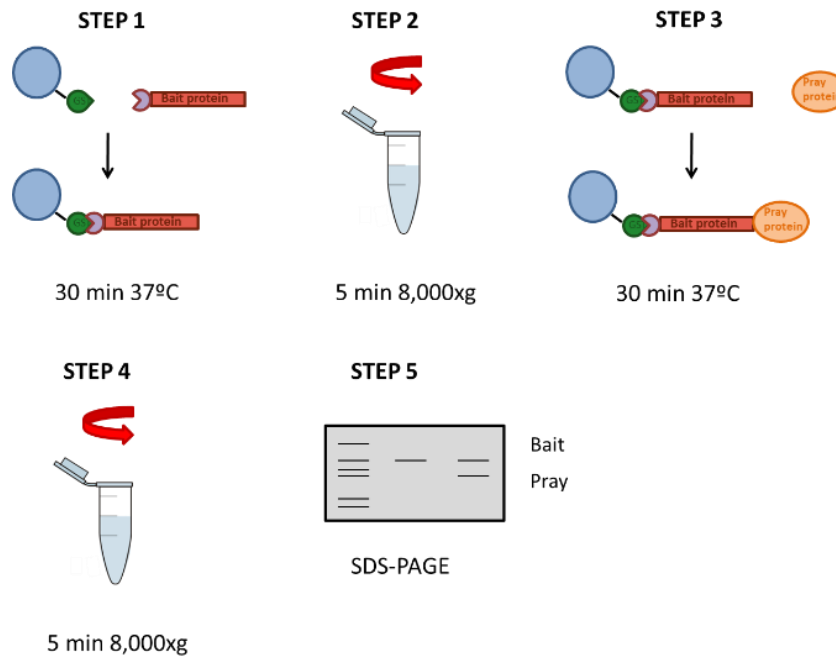
Laburbilduz, uretan diluitutako liposomak kuprezko grid batean kokatzen dira. %2 (w/v) uranil azetato disoluzio urtsua gehitzen zaio jarraian eta laginarekin kontaktuan uzten da 5 minutuz. Ondoren, ura kentzen zaio eta lagina giro tenperaturan zikatzen uzten da mikroskopioan behatu aurretik. Saiakera hauek UPV/EHUko Mikroskopia zerbitzuan burutu ziren.

## **2.2.4 SOLUZIOAN EDOTA MINTZEAN GERTATZEN DIREN PROTEINA:PROTEINA ELKARREKINTZAK AZTERTZEKO METODOAK**

### **2.2.4.1 In vitro pull-down esperimentuak**

In vitro pull-down esperimentuak metodo oso erabiliak dira bi proteina edo gehiagoren arteko elkarrekintza fisikoa aztertzeko (Brymora *et al.*, 2004). Pull-down saio batean, isats bat duen proteina bat, normalean “bait” izena hartzen duena, isatsarekiko espezifikoa den afinitate bidez immobilizatzen da. Immobilizatutako proteina hau, beste proteina batzuekin kontaktuan ipiniko dugu (“pray” deituriko proteinak). Bi proteinen arteko elkarrekintza ematen bada, bigarrena lehenarekin batera immobilizatuta geratuko da eta biak batera, “bait” proteinak duen isatsarekiko afinitatea erabiliz purifikatu ahal izango ditugu. Oso prozedura zuzena da eta gainera oso proteina kantitate txikiak behar dira (2.15 Irudia).

Gure kasuan, GSTBOK $\Delta$ C6His proteina 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH8), %1 CHAPS and %10 glizerol tanpoian dauden GST beaden (Abtbeads) 50  $\mu$ l-tan in inkubatzen da eta ondoren zentrifugatu, bead-etara itsatsitako proteina sedimenta dadin. Gainjalkina jaso eta jalkina erreakzio tanpoiarekin (batuketa tanpoiaren berdina CHAPS Gabe) garbitzen da. Ondoren, bead-etara itsatsitako proteina beste proteinekin inkubatzen da KHE tanpoian 30 minutuz 37°C-tara. Erreakzio nahastura hau zentrifugatzen da ondoren, batutako proteinak batu ez direnen artean banatzeko. Azkenik, bai jalkina zein gainjalkina SDS-PAGE bitartez aztertzen dira.



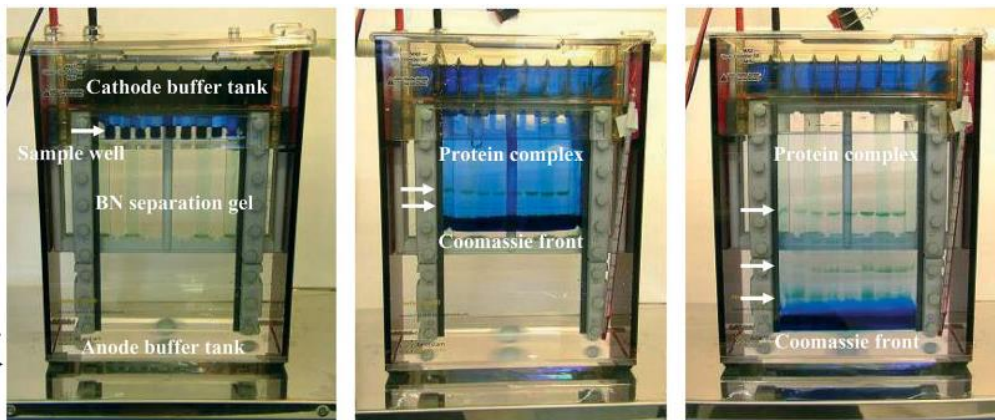
**2.15 Irudia. Pull-down esperimentu baten pausuen diagrama eskematikoa.**

### 2.2.4.2 Gel natiboak

Poliakrilamida gel natibo urdinen elektroforesia (Blue Native PAGE) Schägger eta von Jagow-k deskribatu zuten (Schägger & von Jagow, 1991), entzimatikoki aktiboak diren mintz proteinen konplexuak baldintza leunetan banatzeko. Gel elektroforesi mota honetan, Coomassie Brilliant Blue koloregai anionikoa laginari gehitzen zaio, baldintza fisiologikoetan ematen den elektroforesian zehar proteina konplexuetara batuko dena. Blue Native PAGE mintz biologiko, zelula edo ehun homogenizatuetatik proteina konplexuak pausu bakarrean isolatzeko erabili daiteke. Proteina natiboen masak eta oligomerizazio egoerak zehazteko eta proteina:proteina elkarrekintza fisiologikoak identifikatzeko ere erabilgarria da.

Coomassie-urdina laginari eta kubetan gehitzen den indargetzaile katodikoari gehitzen zaio eta proteina hidrofobiko guztiei eta uretan solugarriak diren proteinei ere batuta mantentzen zaie, eremu elektrikoa aplikatzen zaionean ere. Coomassie-urdina anionikoa da, beraz koloregaia batuta duten proteina konplexu guztiak negatiboki kargatzen dira erabiltzen den pH8-ko tanpoian, eta ondorioz konplexuek anodorantza migratuko dute. Proteina konplexuen banaketa 10 KDaetik 10 MDa-eko tartean ematen da euren tamainaren arabera. Proteina-koloregai konplexu hauek detergenteen absentsian ere solugarriak dira, honek desnaturizazio arriskua gutxitzea dakarrelarik. Proteinen agregazioa ere saihesten da duten karga neto negatiboa dela eta. Proteina eta konplexuen detekzioa zuzena da, itsatsita duten koloregai urdinak ikusgarri egiten baititu (2.16 Irudia).

Tesi honetan gel elektroforesi arruntaren aldaera hau BCL2 familiako proteinen arteko elkarrekintzak aztertzeko erabili da. Erabilitako prozedura hurrengo protokoloan azalduta agertzen da (15. Protokoloa).



#### 2.16 Irudia. Elektroforesi baten pausuen eskema.

##### **15. Protokoloa** Gel natiboak

1-Laginaren prestaketa: Lehenengo eta behin, lagina prestatu behar da, horretarako karga tanpoia (100 mM Tris pH 8, %30 glizerol, %15  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5% Coomassie-Urdin G) gehituko zaio laginari.

2-Indargetzaileen prestaketa: Ondoren, tanpoi katodiko eta anodikoak prestatu behar dira. Bi indargetzaile katodiko behar dira:

1) 100 mM Histidina, Tris-HCl pH 8, %0.002 Coomassie Blue G.

2) 100 mM Histidina, Tris-HCl pH 8.

Indargetzaile anodikoa hurrengoa da: 100 mM Tris-HCl pH 8.8.

3-Lagina kargatu: Lagina egin berri den gel natiboan kargatuko da.

4-Running: Elektroforesia hasi baino lehen, bi gelen arteko putzua katodo tanpoi urdinarekin betetzen da eta kanpoko putzua anodo tanpoiarekin betetzen da ondoren. Elektroforesia martxan jarri eta laginak gelean barneratuko dira, frentearekin batera doan Coomassie urdina gelaren erdialdera ailegatzetik denean katodo tanpoi urdina, kolorerik gabeko katodo tanpoiaz aldatzen da. Frentea gelaren amaierara heltzen denean elektroforesia geratzen da.



### 2.2.4.3 Oligomerizazio saioak

DRP1 proteinaren oligomerizazioa fisio mitokondrialarentzat ezinbestekoa dirudien bitartean, BAX/BAKΔC homo-oligomerizazioa MOMP prozesuan pausu garrantzitsutzat hartzen da. Datu horiek kontutan harturik, tesi honetan oligomerizazioa elkar-gurutzamendu eta gel iragazpeneko kromatografia erabilia aztertu da.

#### 2.2.4.3.1 Elkar-gurutzamendu saioak

BAKΔCren kasuan, bi zisteina endogenoen (C14 eta C166) hurbiltasunak erredox katalizatzailea den cupre (II)- (1-10 fenantrolina) (CuPhe)-ri bi hondar hauen arteko elkar-gurutzamendua ahalbidetzen dio. Modu honetan, SDS-PAGE ez erreduzitzailetan azkarrago migratzen duen forma bat sortzen delarik. cBID-ekin tratatu ostean, bi efektu ikusten dira: (i) BAKΔCren amino terminaleko loopa (C14 duena) proteinatik askatzen da (elkar-gurutzamendu intramolekularrak ekidinez) eta (ii) BAKΔC partzialki dimerizatzen du (elkar-gurutzamendu inter-molekularra). Metodo honen bidez dimeroak baino handiagoak diren oligomeroak ere detekta daitezke (Grant Dewson *et al.*, 2008, 2009).

Tesi honetan, CuPhe bidezko elkar-gurutzamendu saioak burutu dira BH3-domeinu bakarreko proteinek BOKΔC6His modu zuzen batean aktibatzeke duten gaitasuna aztertzeke. BOKΔC-6His-ren kasuan 4 zisteina endogeno agertzen dira, C67, C137, C152 eta C177, hondar hauen arteko elkar-gurutzamendu intramolekularra gerta daitekeelarik.

Oligomeroak detektatzeko, proteina (100-300 nM) liposomekin inkubatzen da KHE indargetzailean 30 minutuz 37°C-tara. Ondoren, CuPhe (CuPhe stocka 30 mM CuSO<sub>4</sub> eta 100 mM 1,10-Phenantrolina 4:1 ur/etanol-ean zegoelarik) gehitzen zaio eta 100-aldiz diluitzen da laginean. 4°C-tara 30 minutuz inkubatu ostean, oxidazio prozesua blokeatzen da 20 mM EDTA gehituz kuprea kelatzeko eta 20 mM N-etilmaleimida ere gehituko zaio erreakzionatu gabeko zisteina hondarrak blokeatzeko. Azkenik, laginak SDS-PAGE ez-erreduzitzaile geletan aztertzen dira eta proteinak Western-plapaketa bidez detektatuko dira bakoitzaren aurkako antigorputz egokia erabiliz.

#### 2.2.4.3.2 Gel iragazpeneko kromatografia

Atal honetan gel iragazpeneko kromatografia (SEC, Ingelesezko *Size Exclusion Chromatography*) DRP1en oligomerizazio egoera aztertzeke erabili da. SEC bidez proteinek mintzean duten egitura kuarternarioari buruzko informazioa jaso dezakegu. Tipikoki, proteina mintzetik ateratzen da mizela tamaina txikia duten detergente ez-desnaturalizatzaileak erabiliz (CHAPS, oktilglukosidoa...) eta gero, lagina gel iragazpeneko kromatografia bidez aztertzen da. Saio hauek egiteko jarraitu den protokoloa jarraian azaltzen da (16. Protokoloa).

### **16.Protokoloa** SEC bidezko oligomerizazio saioa

- 1- Laginen prestaketa: DRP1 (1  $\mu$ M) liposomekin (1 mM) nahasten da KCl indargetzailean eta 30 min 37°C-tara inkubatzen da. Liposomak ondoren %2 CHAPS-arekin lisatu eta solugarria ez dena zentrifugazio bidez (100,000x g 30 min) baztertzen da.
- 2- Gel iragazpena: Gainjalkinak Superdex™ 200 HR 10/30 gel iragazpeneko zutabe batean (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) kargatzen dira, aurretik 25 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, %1 CHAPS, 2 mM DTT-rekin orekatuta dagoena. Kromatografia 60 ml indargetzaile erabilita gauzatzen da eta 1ml-tako frakzioak jasotzen dira.
- 3- Proteinen detekzioa: Frakzioak western plapaketa bidez detektatzen dira.

## **2.2.5 AKTIBITATEA NEURTZEKO SAIOAK**

### **2.2.5.1 GTPasa aktibitate saioa**

DRP1 proteinaren GTPase aktibitatea aurretik deskribatutako (Leonard *et al.*, 2005) malakita berdea erabiltzen duen saio kolorimetrikoarekin aztertu da. Laburbilduz, 0.5  $\mu$ M DRP1 gehitzen zaio 1 mM GTPri eta 30 min 30°C-tara inkubatzen da 100  $\mu$ l indargetzailetan (125 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.4, 1 mM GTP, 4 mM  $MgCl_2$ ). 10  $\mu$ l disoluziori 90  $\mu$ l malakita berde stock soluzio (500  $\mu$ M Malakita berde, Sigma, 10 mM amonio molibdato 1 N HCl-tan) gehitzen zaio eta 650 nm-tara neurtzen da absorbatzia. Steady-state zinetika analizietarako, 0.5  $\mu$ M DRP1 erabili da eta GTP kontzentrazio desberdinak (0, 125, 250, 500, 1000 and 2000  $\mu$ M) erabili dira. 60 minututan 5 minuturo laginak hartuz joan dira eta euren absorbanzia 650 nm-tara neurtu. Hidrolisi maximoaren abiadura ( $V_{max}$ ) eta sustratu kontzentrazioa zeinetan abiadura maximoaren erdia den ( $K_{0.5}$ ) SigmaPlot bidez kalkulatu dira erregreziio ez lineala erabiliz. Saiok hiru bidez errepikatu dira eta signifikantzia estatistikoa Student t testa erabiliz kalkulatu da.

## **2.3 EX-VIVO SAIOAK**

### **2.3.1. MITOKONDRIO SAIOAK**

#### **2.3.1.1 Sagu fibroblasto kultiboetatik mitokondrioen isolaketa**

BCL2 proteinen funtzioak aztertzeko mitokondrioetan aberastutako prestakinak lortzea oso garrantzitsua da. Kultibo zelularrean hazitako sagu fibroblastoetatik mitokondria funtzionalak lortzeko prozedura Frezza *eta* Lank., 2007 –tik egokitu da eta hurrengo protokoloan azalduta agertzen da (17. Protokoloa).

**17.Protokoloa** *Sagu fibroblasto kultiboetatik mitokondrioen isolaketa*

1. Zelulak erain: Lehendabizi,  $120 \times 10^6$  zelula esperimentua egin baino 2-3 egun arinago erain behar dira.
2. Zelulak jaso: Zelulak bi bider izotzean hoztutako PBS-az (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) garbitzen dira. Ondoren, zelulak 25 ml PBS hotzetan altxatu eta 5 minutuz  $950 \times g$ -tara  $4^\circ\text{C}$ -tan zentrifugatzen dira. Gainjalkina bota eta jalkina 4 ml Mitochondrial Isolation Buffer (MIB)etan bersuspenditzen da (210 mM Mannitol, 70 mM sakarosa, 10 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM EDTA eta fresko gehitutako proteasa inhibitzaileak).
3. Zelulen homogeneizazioa: Behin bersuspendituta, aurretik hoztutako 5 ml Kristal-tefloi Elvehjem potter (Sigma-Aldrich) batera pasa eta bertan homogeneizatzen da lagina. Lehenengo homogeneizazioan 15 kolpe ematen dira, gero 10 minutuz  $1500 \times g$ -tara zentrifugatu eta 1 gainjalkina lortzen da, jalkina berriz 2 ml MIB-tan bersuspenditu behar delarik. Bersuspenditutako jalkin hau bigarren aldiz homogeneizatzen da 10 kolpe emanaz eta berriz 10 minutuz zentrifugatzen da  $1500 \times g$ -tara. Gainjalkina jaso eta jalkina 1 ml MIB hotzetan bersuspenditzen da berriro. 5 kolperekina homogeneizatu eta 10 minutuz zentrifugatzen da  $1500 \times g$ -tara. 3 gainjalkina hartu eta jalkina bota.
4. Mitokondrioan isolaketa: Ondoren, 1, 2 eta 3 gainjalkinak jaso eta 10 minutuz  $7000 \times g$ -tara zentrifugatzen dira. Gainjalkinak bota eta jalkina, mitokondrioak dituen,  $400 \mu\text{l}$  MIB hotzetan bersuspenditzen da.
5. Kontzentrazioaren neurketa: Azkenik, mitokondrio kontzentrazioa neurtzen da Bradford bidez, normalean  $400 \mu\text{l} \approx 3 \text{ mg/ml}$  lortzen delarik.

### 2.3.1.2 C-Zitokromo askapen saioak

Araztutako proteina batek MOMP eragiten duen balioztatzeko metodo klasikoa isolatutako mitokondrioetatik c-zitokromo askatzeko duen gaitasuna aztertzea da (Arnoult, 2008; Bossy-wetzel & Green, 2000).

1 mg/ml-tara dauden MEF mitokondrioak 30 minutuz 37°C-tara KCl tanpoian (125 mM KCl, 10 mM Hepes-KOH (pH 7.0), 0.5 mM EGTA) inkubatzen dira interesatzen zaigun proteinarekin batera. Ondoren, laginak 10 minutuz 14000x g-tara zentrifugatzen dira askatutako c-zitokromo mitokondrioen barnean dagoen c-zitokromotik bereizteko. Azkenik, frakzio bakoitzean dagoen c-zitokromo zehazten da modu semi-kuantitatibo baten western plapaketa bidez, sagu anti c-zitokromo antigorputza erabiliz (BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ U.S.A) anti cyt-c antibody clone 7H8.2C12.).

## 2.3.2 ZELULA EUKARIOTIKO PROZEDURAK

### 2.3.2.1 Kultibo zelularra

Sagu fibroblasto Wildtype eta BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> knockout bikoitzak I Marzo (University of Zaragoza, Spain) Doktoreak adeitasunez eman zizkigun. DRP1 knockout sagu fibroblastoak eta HCT 116 zelulak JC Martinou (Université de Genève, Suitza) Doktoreak adeitasunez eman zizkigun. Zelula hauek HeLa eta HEK 293T zelulak bezala %10 fetalbovine sero (Invitrogen) eta %1 Penicylin-Streptomycin-Ionomycin (Invitrogen) soluzioak osagarri moduan dituen Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, U.S.A) medioan hazi dira 5% CO<sub>2</sub> eta 37°C-tara.

### 2.3.2.2 Transfekzio iragankorrerako plasmidoak

Luzera osoko giza BOK cDNA PCR bidez amplifikatu da Pfu Turbo polimerasa erabilita, 2.1.2.1.1 atalean azaltzen den bezala. Errestrikzio guneak hasleen bidez sartu izan direlarik.

Purifikatutako PCR produktuak *MluI* and *XbaI* (NEB) entzimekin ordu betez 37°C-tara liseritu ostean, purifikatu eta aurretiaz errestrikzio entzima berdinekin liseritutako eta ondoren defosforilatutako pCIneo Promega (WI, U.S.A) bektorearekin ligatu izan dira. Bektore honek giza zitomegalobirusaren (CMV) indartzaile goiztiar/promotorea darama, klonatutako DNA intsertoak ugaztun zeluletan adierazteko ahalmena ematen diona. Zenbait klonetan intsertoaren presentzia baieztatu zen eta T7 promotorea erabiliz sekuentziatu izan dira.

Purifikatu eta liseritutako PCR produktuak aldeztatik liseritutako (*Hind III* and *Kpn I*) pEGFP-C3 bektorearekin ere ligatu dira.

### 2.3.2.3 Transfekzio iragankorra

Zelulak jetPRIME® (Polyplus Transfection, France) erabiliz transfektatu dira <http://www.polyplus-transfection.com> web orrian azaltzen diren pausuak jarraituz. Protokolo zehatza jarraian azaltzen da (18. Protokoloa).

#### **18.Protokoloa** *Transfekzio iragankorra*

Jarraian azaltzen diren baldintzak 6-putzutxotako plaka batentzat dira.

1. Zelulak erein: 300.000 zelula putzutxo bakoitzean gehitzen dira eta 2 ml mediorekin hazten dira, esperimentu aurreko egunean.
2. DNA eta indargetzailea nahastu: 2 µg DNA 200 µl jetPRIME® indargetzailean diluitu, bortexeatuz nahasten da.
3. Jetprime gehitu: 4 µl jetPRIME® gehitu eta bortexeaten da.
4. Inkubatu: 10 minutuz inkubatzen dira giro tenperaturan.
5. DNA gehitu: Ondoren, 200 µl gehitzen dira putzu bakoitzeko medioan bertan eta ondo nahasten da.
6. Proteinaren adierazpena aztertu: Proteinaren adierazpena 18 orduz aztertzen da.

### 2.3.2.4 Zelula eukariotoen lerro zelular egonkorretan transfekzio induzigarrirako plasmidoak

Luzera osoko giza BOK cDNA PCR bidez amplifikatu zen *Pwo* polimerasa erabilia eta luzera osoko giza BAX cDNA Expand High Fidelity polimerasa erabilia, 2.1.2.1.1 atalean azaltzen den bezala. Bi kasuetan, errestrikzio guneak hasleen bidez sartu direlarik, BOK-en kasurako HA-isatsa aurreransko hasleen bidez sartu da.

Purifikatutako PCR produktuak *XbaI* eta *BamHI* (NEB) errestrikzio entzimekin ordu betez 37°C-tara inkubatuz liseritu izan dira. Agarosa gel batean korritu ostean, purifikatu eta aurretiaz entzima berdinekin liseritu eta defosforilatutako pF\_UAS\_SV40 bektorean ligatu dira. Zenbait klonetan intsertoaren presentzia baieztatu da eta hasle espezifikoak erabiliz sekuentziatu izan dira.

### 2.3.2.5 Lerro zelular egonkor induzigarrien ekoizpena

Lerro zelular egonkor induzigarriak sortzeko lentibirusetan oinarritutako sistema erabili da. Lentibirusek RNA biriko kantitate handiak zelula ostalariaren DNAn barneratu ditzakete. Ezaugarri horrek, geneak DNAn barneratzeko bektore oso efizienteak egiten ditu. Lentibirusak eraldatutako GIB birusak dira, eta nahiz eta ostalarian erreplikatzeko gai ez diren kontuz lan egin behar da haiekin.

Lerro zelular induzigarriak lortzeko bi bektoretako sistema erabili izan da lan honetan. Modu independentean enpaketatutako beharko ditugu traskripzio faktorearen bektorea pFU GEV16 PGK Hygro, eta gure proteinaren sekuentzia daramana, pF 5x UAS SV40 puro. Ondoren independenteki enpaketatutako bi eraikuntza hauetatik lortutako lentibirusak infektatu nahi diren zelulei gehituko zaizkie eta higromizina eta puromizinarekin hautaketa egingo da. Hautaketa bikoitz honek eraginkortasun handia bermatzen du. Traskripzio faktorea zein aztergaia den DNA enpaketzeko hurrengo bektoreak erabili izan ditugu:

pCMV  $\delta$ R8.2 Partikula biralak sortzeko enpaketatze plasmidoa

pCMV-VSVG Partikula biralak sortzeko bilkin plasmidoa

#### **19.Protokoloa** Lerro zelular egonkor induzigarrien ekoizpena

1-Transkripzio faktorea kodetzen duen DNArekin HEK 293T zelulak transfektatu: Lentibirusak sortzeko HEK 293T zelulak transfektatu behar dira: osagai estrukturala kodetzen duen plasmidoaren, pCMV  $\delta$ R8.2, 5 unitate; adierazpen lentibiralerako bektorearen, pF 5UAS edo pFU GEV16, 3 unitate; eta bilkina kodetzen duen plasmidoaren, pVSV-G, 2 unitate erabilia.

2-Lentibirusak jaso: Transfekzioa egin ostean zelulak 37°C-tara inkubatzen dira 24-48 orduz, orduan gainjalkina jaso eta 0.8  $\mu$ m-ko filtro esteriletatik filtratu.

3-Intereseko zelulen infekzioa: Ondoren, Polybrene (1  $\mu$ l/ml) gehitzen zaio eta ondo nahasten da. Infektatu nahi diren zelulen mediao gainjalkin honengatik ordezkatzeko da gero.

(protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

4-Hautaketa: 24 ordu geroago, gainjalkina medio berriz ordezkaten da eta hautaketarako antibiotikoa gaineratzen zaio, erabilitako bektorearen kasuan higromizina edo puromizina erabiliko dira. Antibiotiko hauek 3-4 egunero aldatu behar dira, oso denbora aldi luzeetan ez direlako egonkorrak. Kontrol moduan, infektatu gabeko zelulak antibiotikoen presentzian hasiko ditugu. Infektatu gabeko zelula hauek hiltzen direnean, selekzioa amaitutzat jo dezakegu.

5-HEK 293T zelulen transfekzioa intereseko DNArekin: HEK 293T zelulak transfektatzen dira 1. pausuan azaldu den bezala, gure proteina kodetzen duen adierazpen antibiralerako bektorearekin. Ondoren, bigarren pausutik laugarren pausura errepikatzen da prozesua, hautaketa amaitutzat ematen dugunerarte.

### **2.3.2.6 Transfekzio induzigarria**

HA-BOK HeLa zelula induzigarriak ekoitzi ditugu eta zelulak hauek  $1\mu\text{M}$  4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)rekin tratatu izan ditugu HA-BOK proteina adierazi nahi den momentua baino 24 ordu lehenago.

### **2.3.2.7 Zelulen fixaketa eta iragazkortzea**

Fixaketak antigenoak immobilizatu behar ditu egitura zelular eta subzelularra mantentzen den bitartean. Antigorputzak zelula konpartimentu guztietara sarbide izatea baimendu behar du. Fixaketa eta permeabilizazio metodoak epitopoa eta antigorputzaren sentikortasunaren araberakoak izango dira eta horren arabera optimizazioa beharrezkoa izango da.

Lehenego eta behin, estaldurak petri plakan ipini behar ditugu zelulak haien gainean haz daitezen. Ondoren, zelulak gaineratu eta egoera normaletan haziko ditugu (%10 fetalbovine seroa, %1 Penizilina-Streptomizina-Ionomizina soluzioa eta % 1aminoazido ez-esentzialak gaineratuta dituen Dulbecco's Modified Eagle Medioan, %  $5\text{CO}_2$  atmosferan  $37^\circ\text{C}$ -tara). Behin konfluente daudenean, medioa xurgatuko dugu eta zelulak bi bider izotzetan hoztutako PBStan garbituko ditugu. Ondoren, zelulak PBS-tan diluitutako %4 Formaldehidorekin fixatuko dira 20 minutuz. Fixaketa tanpoiak zelulen azalera estali behar du, sikatu ez daitezen (250  $\mu\text{l}$  tanpoi inguru 24 putzu dituen plaka baten putzu bakoitzeko, 1 ml 6 putzu dituen plaka baten putzu bakoitzeko...). Gero, formaldehidoa kendu eta toxikoen hondakin botilara botako dugu. Zelulak beste hiru bider PBS-rekin garbitu.

Fixatu ostein batzuetan zelulak permeabilizatu behar dira. Permeabilizazioa bakarrik beharrezkoa da antigorputzak zelulan barneratu behar denean proteina detektatzeko. Hala ere, mintz proteinak detektatzeko ere beharrezkoa izaten da batzuetan, epitopoa alde zitoplasmatikoan kokatzen bada. Horretarako, zelulak azetona hotzarekin inkubatzeko ditugu 10 minutuz  $-20^{\circ}\text{C}$ -tara. Ondoren, azetona kendu eta PBSrekin hiru bider garbitzen ditugu estaldurak.

### 2.3.2.8 Immunofluoreszentzia tindaketa

Immunofluoreszentzia oso teknika eraginkorra da, fluoreszenteki markatutako antigorputzak antigeno espezifikoak detektatzeko erabiltzen dituena. Erabilgarritasunen artean, suspentsioan dauden zelulen, zelula kulturen, ehunen, beaden ebaluaketa eta proteina espezifikoek detekzioarako mikroarriak ditugu. Immunofluoreszentzia teknikak bai lagin fresko bai fixatutako laginekin erabili daitezke. Immunofluoreszentzian, antigorputzak zunda fluoreszenteekin kimikoki konjugatuta daude. Markatutako antigorputz hauek intereseko antigenoari batu eta antigenoaren detekzioa baimentzen dute zenbait immunofluoreszentzia tekniken bidez, fluxuzitometria, fluoreszentzia edo mikroskopia konfokala besteak beste. Erabilitako prozedura hurrengo protokoloan azaltzen da (20. Protokoloa).

#### **20.Protokoloa** *Immunofluoreszentzia tindaketa*

1-Zelulen fixaketa eta iragazkortzea: Zelulak estalduretan hazi behar dira. Ondoren, fixaketa egingo da horretarako, zelulak PBS-tan diluitutako 4% Formaldehidorekin fixatuko dira 20 minutuz. Fixatu ostein batzuetan zelulak permeabilizatu behar dira. Permeabilizazioa bakarrik beharrezkoa da antigorputzak zelulan barneratu behar denean proteina detektatzeko. Horretarako, zelulak azetona hotzarekin inkubatzeko ditugu 10 minutuz  $-20^{\circ}\text{C}$ -tara, PBSrekin hiru aldiz garbitu ostein. Ondoren, azetona kendu eta PBSrekin hiru bider garbitzen ditugu estaldurak.

2-Blokeoa eta antigorputzekin inkubazioa: Behin zelulak fixatuta eta permeabilizatuta, immunofluoreszentzia tindaketarekin has gaitetzke. Estaldurak parafilm baten gainean ipintzen dira petri dish baten barruz, zelulak gorantza kokatuta daudelarik. Gero, blokeatuko ditugu %0.1 Triton X-100 eta %3 BSA duen PBSrekin 45 minutuz.

(protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

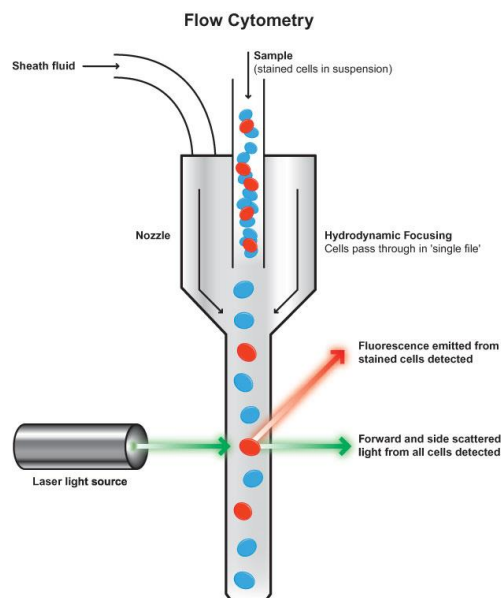


Blokeoa kendu eta hiru bider garbituko ditugu %0.1 Triton X-100 duen PBSarekin (PBST). Hurrengo pausua antigorputz primarioarekin inkubatzeta da, %0.1 Triton X-100 eta %3 BSA duen PBSrekin 60 minutuz. Inkubazioaren ostean, berriz garbituko ditugu estaldurak 3 bider PBSTrekin. Ondoren antigorputz sekundarioarekin inkubatuko ditugu ordu batez, ordua pasatzen denean hiru bider garbituko ditugu PBSTrekin.

**3-Montaketa:** Lehendabizi, estaldurak ur distilatuarekin garbitzen dira. Gero, montaketa medio (Fluorsave) tanta bat gaineratzen zaio portari, estaldura tanta horren gainean ipiniko dugu zelulak beherantza begira daudelarik. 10 µl-tako pipeta baten puntaren alde zabala erabiliko dugu estaldura zapaldu eta burbuilak ekiditeko. Amaitzeko, portak ilunpetan gordeko ditugu giro tenperaturan guztiz lehor daudenerarte.

### 2.3.2.9 Fluxu zitometria saioak

Fluxu zitometria zelulak bezalako partikula indibidualen propietate fisiko asko aldi berean neurtzeko herraminta erabilgarria da. Zelula bakoitzak laser sortatik pasatzen den heinean argia nola dispersatzen duen eta fluoreszentzia nola igortzen duen neurtzen du (2.17 Irudia).



2.17 Irudia. Fluxu-zitometro baten eskema.

(<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11446>)-tik hartutako irudia.

Apoptosian zehar aldaketa ugari ematen dira zelula morfologian eta markatzaile molekular zein biokimiko askoren agerpena gertatzen da. Apoptosia eragiteko mekanismo aldaketa horiek

desberdinak izan daitezke, aztertzen den denbora tarte eta zelula motaren arabera. Zelula indibidualak oso era azkar batean neurtzeko ahalmena dela eta, fluxu-zitometria zelula populazio handietan apoptosia detektatu, identifikatu eta neurtzeko oso harriminta egokia da (Wlodkowic *et al.*, 2012). Lan honetan, The Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, San Jose, CA) erabili izan da. Annexina fosfatidilserinara (PS) batzen den proteina da, fluxu-zitometria bidez apoptosia ebaluatzeko askotan erabiltzen dena. Zelula osasuntsuek mintz plasmatico asimetrikoa dute, PSa monogerruza zitosoan kokatzen delarik. Apoptosian zeharreko aktibazio zelular, kalte zelular edo energia galerak mintz plasmaticoaren asimetrikotasuna hausten dute, PS gainazalean azaltzen delarik (Janko *et al.*, 2013).

Lan honetan fluxu-zitometria GFP-BOK-ekin transfektatutako eta staurosporinarekin tratatutako BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> knockout (DKO) sagu fibroblasto zeluletan eta HA-BOK adierazteko induzigarriak diren HeLa zeluletan apoptosia identifikatzeko erabili izan da. Jarraitu den prozedura zehatza hurrengo protokoloan azaltzen da (21. Protokoloa).

#### **21. Protokoloa Fluxu-zitometria saioak**

1. Zelulak transfektatu: Zelulak GFP-BOK plasmidoarekin transfektatu dira 2.3.2.3 atalean azaltzen den bezala.
2. Apoptosi indukzioa: Trasekzioa egin eta 18 orduz, apoptosia eragiten da 1  $\mu$ M staurosporinarekin.
3. Zelulak jaso: Zelulak 3,7 eta 16 orduz jasotzen dira eta bi bider izotzarekin hoztutako PBS-rekin garbitzen dira.
4. PS esposaketaren neurketa: Ondoren, apoptosia Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, San Jose, CA) erabiliz neurtzen da, horrela: Zelulak bi bider Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) tanpoiarekin garbitzen dira, ondoren 100  $\mu$ l 1X binding buffer-tan bersuspenditu. Annexin V-PE 5  $\mu$ l gehitu eta 15 minutuz giro tenperaturan ilunpean inkubatzen dira. Amaitzeko 400  $\mu$ l 1X binding buffer gehitu ostean FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) aparailuan aztertzen dira laginak.

#### **2.3.2.10 Frakzionamendu azpizelular saioa**

Entsegu honen helburu nagusia zelulen mintz frakzio eta frakzio zitosoaren arteko banaketa lortzean datza. Horretarako, zelulak lehenengo eta behin PBS hotzarekin garbitu eta permeabilizazio tanpoian (20 mM HEPES/KOH pH7.5, 100 mM sakarosa, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.025% digitonina, proteasa inhibitzaile pastila bat) bersuspenditzen dira. Behin

bersuspendituta zelulak izotzetan inkubatzen dira 10 minutuz. Ondoren, laginak 13,000x g-tara zentrifugatzen dira 5 minutuz 4°C-tara eta jalkina eta gainjalkina banatzen dira. Gainjalkina frakzio zitosolikoa izango da, jalkinean aldiz, mintz frakzioa dago. Bi frakzioa hauek jarraian aztertuak dira western plapaketa bidez intereseko proteinaren aurkako antigorputza erabiliz, modu horretan bere lokalizazio azpizelularra ezagutuko delarik.

### 2.3.2.11 Sodio karbonato tratamendua

Behin frakzio zitosoliko eta mintz frakzioak banatuta daudenean, intereseko proteina mintzera atxikituta dagoen edo ez aztertzea posiblea da. Horretarako, mintz frakzioak 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5 tanpoian bersuspenditu eta izotzetan inkubatzen dira 20 minutuz. Ondoren, 400 mM Tris HCl, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> and DNAasa tanpoia gehitzen zaie eta hamar minutuz inkubatzen dira laginak 37°C-tara. Gero, laginak 13,000x g-tara zentrifugatzen dira 10 minutuz 4°C-tara eta jalkin eta gainjalkinak banatzen dira. Gainjalkinean mintzari lotutako proteinak egongo dira eta jalkinean aldiz mintzean txertatutakoak. Bi frakzio banandu hauek western plapaketa bidez aztertuko dira proteinaren aurkako antigorputza erabiliz.

### 2.3.2.12 GFP-trap immunoprezipitazioa

Immunoprezipitazioa (IP) disoluzio batetik proteina bat prezipitatzeko teknika da, proteina zehatz horrekin espezifikoki batzen den antigorputza erabilita. Prozesu hau milaka proteina desberdin dituen laginetik proteina zehatz bat isolatu eta kontzentratzeko erabili daiteke. Kasu honetan, GFP-trap kita (chromotek) erabili izan dugu HEK 293T zeluletan modu iragankorrean transfektatutako GFP-BOK proteina immunoprezipitatzeko eta proteina honekin batera ko-immunoprezipitatzeko duten proteinak identifikatzeko. Metodologia zehatza hurrengo protokoloan azalduta dago (21 Protokoloa).

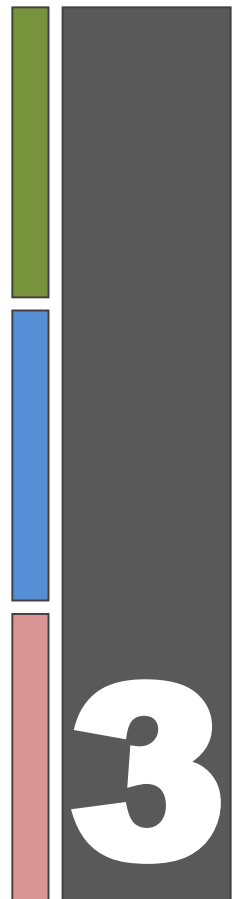
#### **Protokolo 21** *GFP-trap immunoprezipitazioa*

1. Zelulen transfekzioa: Zelulak GFP-BOK plasmidoarekin transfektatu 2.3.2.3 atalan azaltzen den prozedura jarraituz. Immunoprezipitazio erreakzio baterako GFP isatsa duen proteina adierazten duten ~10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ugaztun zelula erabiltzea gomendatzen da.
2. Zelulak jaso: Kultibo medioa xurgatu, 1 ml PBS zelulei gehitu eta zelulak plakatik hazkatu. Gero, zelulak 500x g-tara 3 minutuz 4°C-tara zentrifugatu eta jalkinak jaso behar dira. Jalkin hau bi bider PBS hotzarekin garbitu eta bersuspenditu.

(protokoloak hurrengo orrialdean jarraitzen du)

3. Zelulak lisatu: Jalkin zelularra proteasa inhibitzaileak gehituta dituen 200 µl lisi tanpoian bersuspenditu. Gero, tutua izotzetan 30 minutuz utzi 10 minuturo pipeteatuz. Ondoren, lisatu zelularra 20.000x g-tara 5-10 minutuz 4°C-tara zentrifugatu eta gainjalkina aurrez hoztutako tutura pasatu.
4. GFP-BOK batuketa: Lisatu zelularren gainjalkina 500 µl-1000 µl bolumen izan arte proteasa inhibitzaileak gehituta dituen diluzio tanpoiarekin diluitzen da. Puntu honetan detergenteek ezin dute %0.2 gainditu batuketa espezifikoak saihesteko. Lagina aztertzeko lisatu zelularren gainjalkineko 50 µl jaso eta SDS karga tanpoia gehitzen zaio, hau inputa izango da. Bitartean, GFP-Trap diluzio tanpoian orekatu behar da, horretarako 25 µl bead aurrez hoztutako 500 µl diluzio tanpoian bersuspenditzen dira eta 2.500x g-tara 2 minutuz 4°C-tara zentrifugatuko dira. Gainjalkina baztertu eta bi aldiz errepikatu. Diluitutako gainjalkina orekatutako GFP-Trapera gehitu eta ordu betez giro tenperaturan inkubatuko dira.
5. Garbiketak: Tutua 2.500x g-tara 2 minutuz 4°C-tara zentrifugatu. Lagina aztertzeko gainjalkineko 50 µl gorde, hau batu ez den lagina izango delarik. Gainontzeko gainjalkina bota eta beadak hiru aldiz hotz dagoen garbiketa tanpoiaren 500 µl gehituta garbitu. Azkeneko garbiketa pausuan, beadak tutu berri batera pasatuko dira.
6. Gela kargatu: Beadak SDS karga tanpoi 100 µl-tan bersuspenditu eta 10 minutuz 95°C-tara inkubatu immunokonplexuak disoziatu daitezten. Ondoren 2.500x g-tara 2 minutuz 4°C-tara zentrifugatu eta SDS-PAGE analisia bututuko da gainjalkinarekin (batutako proteina).
7. Mass spectrometria: Gure proteina ondo immunoprezipitatu dela western plapaketa bidez baieztatu ostean, laginak masa espektrometria bidez aztertu izan dira GFP-BOK proteinareki batera ko-immunoprezipitatu duten proteinak identifikatzeko.

# CHAPTER 3: RESULTS AND DISCUSSION





## 3.RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. KARDIOLIPINAREKIKO INTERAKZIO ESPEZIFIKOAK DRP1 PROTEINAREN AKTIBAZIO FUNTZIONALA ERAGITEN DU

#### 3.1.1 SARRERA

Mitokondrioak organulu konplexuak dira non zelularen egoera fisiologiko egokia mantentzeko ezinbestekoak diren zenbait prozesu ematen diren. Egoera osasungarrian, mitokondrioak zelula energiari hornitzen du fosforilazio oxidatiboaren bidez lortzen den ATParekin. Horretaz gain, mitokondrioek zenbait prozesu anaboliko eta katabolikoetan ere parte hartzen dute (Saraste, 1999). Azken bi hamarkadetan mitokondrioak apoptosian ere funtzio papera betetzen duela ezagutzera eman da. Zenbait estimulu apoptotikok mitokondriatik faktore apoptogenikoen askapena eragiten dute, kaspasen aktibazioa eragingo duena (Chipuk *et al.*, 2010; Nunnari & Suomalainen, 2012).

Mitokondrioak zelularen egoera fisiologiko eta inguruko baldintzen arabera fusio eta fisio prozesuak pairatzen dituzten organulua oso dinamikoak dira (Herzig & Martinou, 2008; Youle & van der Bliek, 2012). Fusio mitokondrial prozesuan ematen diren anormaltasunak zenbait giza neuropatiekin erlazionatu izan dira, besteak beste Charcot-Marie-Tooth 2 motako gaixotasuna (Cartoni *et al.*, 2010) edo Atrofia Optiko Dominantearekin (Alexander *et al.*, 2000; Zanna *et al.*, 2008), bestalde, fisio mitokondrialean emandako akatsak beste gaixotasun batzuekin erlazionatu dira, Parkinson gaixotasuna (Deng *et al.*, 2008; Poole *et al.*, 2008) eta Alzheimer gaixotasuna (Cho *et al.*, 2009) besteak beste. Morfologia mitokondrialaren dinamika, dinaminarekin erlazionatutako GTPasek erregulatzen dute. Proteina hauek mintz egiturak berrantolatzeko gaitasun intrintsekoa dute, horretarako oligomerizatu eta GTPa hidrolizatu behar dutelarik (Hoppins *et al.*, 2007; Youle & van der Bliek, 2012). Ugaztunetan, fusio mitokondrialean parte hartzen duten dinaminarekin-erlazionatutako GTPasak barne mintzeko OPA1 (Optic Atrophy 1) eta kanpo mintzeko MFN1 (Mitofusin 1) eta MFN2 (Mitofusin 2) dira (Song *et al.*, 2009). Bestalde, fisio mitokondrial DRP1en menpe dago, zeina peroxisomen banaketan ere parte hartzen duen (Koch *et al.*, 2003; Lackner *et al.*, 2009; Smirnova *et al.*, 2001; Smirnova *et al.*, 1998). Saguetan DRP1 funtzioaren ablazioak proteina honek enbrioien burmuin eta beste ehunen garapenerako duen garrantzia erakutsi du (Ishihara *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2009). Dinaminarekin-erlazionatutako GTPasek apoptosiaren garapen egokian ere

funtsezko papera betetzen dute (Martinou & Youle, 2011). Zentzu honetan, DRP1 proteinak BAXen oligomerizazioa eta c-zitokromoaren askapena mintz mitokondrialaren hurbilketa eta hemifusioa eraginez suspertzen dituela erakutsi dugu (Montessuit *et al.*, 2010). Horretaz gain, zelula osasuntsuetan OPA1 oligomeroetan antolatzen dela ikusi da, horrela gangar mitokondrialen arkitektura mantenduz. Apoptosian aldiz, OPA1 oligomeroak desantolatu eta c-zitokromoaren askapen egokia baimentzen dute (Frezza *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2008).

DRP1ek funtzionalki desberdinak diren lau domeinu ditu: GTPasa domeinua (G); “bundle signaling element” delakoa (BSE), G domeinutik txortenera ematen diren konformazio aldaketen transmisioan inplikatur dagoena; B intsertoa, DRP1en funtzioaren erregulazioan inplikatur dagoena; eta txortena, DRP1 multimerizazioan inplikatur dagoena (Fröhlich *et al.*, 2013). DRP1 inaktiboa nagusiki zitosolikoa da, nahiz eta proteinaren kantitate txiki bat etorkizunean fisio gune bilakatuko diren mitokondriako eskualde zehatzetan ere aurkitu daitekeen (Smirnova *et al.*, 2001), ustez erretikulu endoplasmatikoko mitokondrioa ukitzen duen guneetan (Friedman *et al.*, 2011; Korobova *et al.*, 2013). DRP1 funtzioaren aspektu desberdinak, lokalizazioa, egonkortasuna eta GTPasa aktibitatea besteak beste, itzulpen osteko eraldaketen bidez erregulatuak izan daitezkeela proposatu da. Eraldaketa horiek fosforilazioak (Cereghetti *et al.*, 2008), SUMOilazioak (Figuroa-Romero *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013), ubikitinazioak (Nakamura *et al.*, 2006), O-lotutako-N-acetyl-glukosamina glikosilazioak (Gawlowski *et al.*, 2012), eta S-nitrosilazioak (Chang & Blackstone, 2010; Cho *et al.*, 2009) izan daitezke. Itzulpen osteko aldaketa gehienak B intsertoan ematen dira.

DNM1ekin, DRP1en legamietako ortologoa, egindako ikerketetan oinarrituz, DRP1 mitokondriora translokatzan denean FIS1 proteinari batzen dela proposatu zen, MDV1 edo CAF4 proteina adaptatzaileen bidezko interakzio baten bitartez (Hoppins *et al.*, 2007). Nahiz eta FIS1 eukariotoen erresuman zehar, gizakietan barne, oso kontserbatuta egon, ugaztunetan MDV1 eta CAF4 proteinen homologoak aurkitzeke daude. Gainera, duela gutxiko ebidentziek FIS1 proteinak ugaztunen morfologia mitokondriala DRP1ekin batuz egin beharrean, GTPasa aktibitatea erregulatzeko domeinua duen TBC1D15 proteina bilduz egiten duela iradokitzen dute (Onoue *et al.*, 2013). Horretaz gain, ugaztunen zeluletan DRP1 mitokondrioa kokatzeko eta bere erregulazio funtzionalerako ezinbestekoak izan daitezkeen beste zenbait proteina aurkitu dira berriki. Horien adibide dira MFF, MiD51 eta MiD49 proteinak, zeinak bai DRP1ren mitokondriarako errekrutatze zein fisioaren estimulazioan inplikatur dauden (Koirala *et al.*, 2013; Otera *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2011). Garrantzizkoa da aipatzea, ez MFF ezta MiD49 proteinak ere ezin dutela DRP1en GTP hidrolisi aktibitatea GTPasa efektore klasikoek egiten duten bezala areagotu (Koirala *et al.*, 2013), horregatik interakzio hau DRP1en aktibazio funtzionala eragiteko nahikoa den probatzea falta da.



Proteinez gain, lipido zehatzek ere dinamina klasiko eta dinaminarekin-erlazionatutako proteinen faktore erregulatzaile bezala joka dezakete. Dinamina klasikoek Plekstrin homologia (PH) domeinua dute, zeina PIP<sub>2</sub> lipidoarekin interakzionatzen duen proteinen oligomerizazio eta funtzioa erregulatuz (Heymann & Hinshaw, 2009; Kenniston & Lemmon, 2010). Bestalde, dinamina-moduko proteinek, legamietako Mgm1 edo giza OPA1 proteinek besteak beste, ez dute PH domeinurik, nahiz eta mitokondrioko lipido polianioniko espezifikoa den kardiolipinarekin interakzionatzen dutela behatu den. Gainera, Mgm1 eta OPA1 proteinek CLrekin duten elkarrekintzak euren GTPasa aktibitatea areagotzen du (Ban *et al.*, 2010; DeVay *et al.*, 2009; Rujiviphat *et al.*, 2009). CLak beraz, funtzio mitokondrialean funtsezko papera jokatzen duela esan genezake (Claypool & Koehler, 2012; Osman *et al.*, 2011). CL nagusiki mitokondriako barne mintzean kokatzen da, bereziki mintz mitokondrialen kontaktu guneetan (Ardail *et al.*, 1990). Interesgarria da aipatzea, apoptosian zehar DRP1 zitosoletik MOMera translukatzen dela eta BAXekin kolokalizatzen du, CLan aberatsak diren guneetan (Karbowski *et al.*, 2002; Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008). Gainera, DRP1ek CL duten liposomekin zuzenki interakzionatzen duela aurkitu da (Montessuit *et al.*, 2010). Behaketa horietan oinarrituta, DRP1:CL elkarrekintzaren espezifitate molekularra eta interakzio horren ondorio funtzionalen inguruko ezagumendu zehatzagoa izaten saiatu gara. Kapitulu honetan, DRP1 proteinak CLrekin zuzenean B insertoaren bidez interakzionatzen duela iradokitzen duten ebidentziak eskeintzen ditugu, eta baita interakzio honek DRP1en oligomerizazioa eta bere GTPasa aktibitatearen estimulazioa eragiten duela proposatzen dugu.

### 3.1.2 MATERIALAK ETA METODOAK

**Materialak-** Arrautz fosfatidilkolina (PC), arrautz fosfatidiletanolamina (PE), gibel fosfatidilinositola (PI), bihotz kardiolipina (CL), burbuin fosfatidilserina (PS), eta arrautz fosfatidilglicerola (PG) Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster,AL) enpresan erosi dira. Anti DRP1 antigorputzak. BD-Biosciences enpresakoak dira eta Thermo Scientific. Biacore sensor chip L1 GE Healthcare enpresatik erosi da.

**Proteina birkonbinatuen adierazpena eta arazketa-** Isatsik gabeko DRP1 1, 2 eta 3 isoformak eta B insertoko mutanteak (K557-560A, K569-571A eta K557-560-569-571A) *Escherichia coli* Rosetta zeluletan ekoiztu dira. Zelulak 37°C-tan 100 mg/ml anpizilina duen LB medioan hazi dira 0.9ko OD600 izan arte, orduan 0.5 mM isopropyl b-D-tiogalaktopiranosidoa (IPTG) gehitu eta zelulak 12 h 18°C-tara inkubatzen dira. Zelulak zentrifugazio bidez batu dira 3,500x g-tara 30 minutuz. Ondoren A tanpoian (20 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1tb Protease inhibitzaileak, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml liozima, 0.05 mg/ml DNAsa) bersuspenditzen dira. Zelulak French press bidez apurtu eta 20,000x g-tara 15 minutuz zentrifugatzen dira. Gainjalkinak jaso eta kitinazko erretxinaz enpaketatuko zutabe batetik

pasatuko da, 10 ml-ko bolumena duena (New England Biolabs, Inc.) eta A tanpoian orekatuta egon behar duena. Batu ez den proteina B tanpoiaren (20 mM Hepes pH 7, 10% glizerol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 500 mM NaCl) 10 zutabe bolumenekin garbitzen da. Tiol errektiboek eragindako mozketak kitinazko erretxina 0.5 mM dithiothreitol (DTT) duen B tanpoia azkar gehituz hasiko dugu. Mozketak erreakzioa gaua osoan zehar emango da 4°C-tan, hurrengo egunean proteina zutabetik eluituko delarik. Proteina C tanpoiaren (25 mM Hepes pH 7.5, 10% glizerola, 0.5 mM DTT, 100 mM NaCl) kontra dializatuko da eta ondoren C tanpoian orekatutako Q sepharosa zutabearen kargatuko da. Batu ez den proteina C tanpoiaren 10 zutabe bolumenez garbitzen da eta DRP1 eluitu izango da tanpoiaren NaCl kontzentrazioa 500 mM arte igoz. DRP1 duten frakzioak D tanpoian (25 mM Hepes pH 7.4, 10% glizerola 0.5 mM DTT, 150 mM NaCl) orekatutako Sephadex S200 zutabearen kargatuko dira. DRP1 duten frakzioak euren artean batu eta E tanpoiarekiko (25 mM Hepes pH 7.4, 10% glycerol, 0.5 mM DTT, 150 mM KCl) dializatuko dira.

**Liposomen prestaketa-** Lipido nahasketak kloroformo:metanoletan (2:1) disolbatu ondoren, disolbatzaile organikoak ebaporazio bidez kenduko dira 2 orduz huts ponpan egonda. Lipido geruza lehorrak KCl tanpoian (150 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES-KOH pH 7.4) bersuspendituko dira jarraian. Lamela bakarrekiko besikula handiak (LUVs, ingelesetik *Large Unilamellar Vesicles*) Mayer *eta lank.* metodoa jarraituz eratu izan dira (Mayer *et al.*, 1986), 10 izozte/desiozote ziklo eginez eta estrusiorako 0.2 mm-ko poro tamaina duten polikarbonatozko bi mintz erabiliz (Nucleopore, San Diego CA). Lipido kontzentrazioa Bartlett *eta lank.* metodoa erabiliz zehaztu da. (Bartlett, 1959).

**Liposomen sakarosa gradiente bidezko zentrifugazioa-** Araztutako DRP1 (1 mM) 200 mM liposomekin (0.3% rodaminz-PE duten liposomak, begi bistaz ikuskatzeko) inkubatu da 30 minutuz 37°C-tara 150 ml-ko (KCl buffer) bolumen finalean. Proteina/lipido nahastura 300 ml-tara diluitzen da 2.4 M sakarosa duen KCl tanpoian. Ondoren, erreakzio nahastura zentrifuga hodi batera pasatzen da. 2.4 M sakarosa geruzari, 0.8 M sakarosa duen 400 ml KCL tanpoia gehitzen zaio eta ondoren 0.5 M sakarosa duen 300 ml KCl tanpoi gehituko dira. Ondoren TLA-120.2 errotorean 400,000x g-tara 3 orduz 4°C-tara zentrifugatuko dira. 250 ml-ko lau frakzio jasoko dira azpitik (4 frakzioa) gora (1 frakzioa). Goiko frakzioak (1.frakzioa) liposomak ditu, rodaminaren fluoreszentiagatik ikusi daitezkeenak, azpiko frakzioak (4. frakzioa) batu gabeko proteina izango du. Bi frakzio hauek SDS-PAGE eta Western plapaketa bidez aztertu dira.

**Estraktu zitosolikoaren prestaketa-** Sagu fibroblasto enbrionikoak (MEFs) MB tanpoian (210 mM manitola, 70 mM sakarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes pH 7.4) bersuspenditu dira eta 5 ml-ko xiringa bati akoplatutako 25 G1 0.5625 orratz batez gutxienez 10 aldiz pasatuz apurtu dira eta ondoren 100,000x g-tara 30 minutuz 4°C-tara zentrifugatu dira.

**Dot plapaketa-** Mintz lipido tirak Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT) enpresan erosi dira. Tira hauek fabrikatzaileak aditzera ematen duen bezala erabiliak izan dira. Bestalde, fosfolipido desberdinen stock soluzioak erabiliz ere tira batzuk ekoiztu ditugu: lipidoak 2:1:0.8 MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O-etan disolbatu eta Hybond C Nitrocellulose mintzetan tantaka gehitu ostean, zikatzen utzi izan zaie. Nitrozelulosa ondoren %1 esnea duen PBS-tan blokeatu da ordu betez eta beste ordu betez DRP1ekin inkubatu da PBS-tan 37°C-tara. Tirak hiru biderrez PBS-rekin garbitu eta anti DRP1 antigorputzarekin 1:2,000 diluzioan ordu betez inkubatu dira. Tirak bi bider PBSrekin garbitu eta antigorputz sekundarioan (anti sagu) 1:5,000 diluzioan inkubatu dira. Hiru bider PBSrekin garbitu ostean proteinak kimiluminiszentzia bidez detektatu dira.

**SPR Analiak-** SPR neurketak BIAcore X-100 sistemarekin burutu dira L1 txipa erabiliz (BIAcore). L1 txipa liposomekin prestatzeko, 20 mM CHAPS 10 ml injekatu dira 10 ml/min-ko fluxuarekin. Liposomak (2 mM lipido kontzentrazio finala) fuxu berdinarekin injektatu dira 3 minutuz. Injekzio guztiak 37°C-tara egin dira. L1 txipa birsortu da ondoren, 20 mM CHAPS eta %0.4 SDS injekzioak errepikatuz, hasierako erresonantzia unitateak (RU) lortu arte. Proteinak laginak SPR analisirako prestatzeko erabili den tanpoi berdinarekiko dializatzen dira. Proteina ondoren liposomak dituen txipetik pasako da 10 ml/min fluxuarekin. Tanpoiak eragiten duen RU aldaketa laginak eragiten duen seinaletik kenduko da. DRP1 kontzentrazioa 0.6 mM izan da. Signifikantzia estatistikoa Student's t-test erabiliz balioetsi da.

**Monogeruza Azalera Presio Neurketak-** Azalera presio neurketak Kibron (Helsinki, Finland) enpresako MicroTrough-S system-arekin egin dira 37°C-tara eta era konstatean irabiatuz. Lipido monogeruzak hurrengo konposaketa lipidikoekin prestatu dira: 80PC/20PE, 28PC/20PE/ 52PG, 28PC/20PE/52PS, eta 54PC/20PE/26CL (mol/mol). Kloroformotan disolbatutako lipidoa KCL tanpoiaren 1 ml gainazalean zehar banatzen da eta gainazala konstante mantenduko da. Hasierako gainazal presioa aire/ur interfasean gehitutako lipido kantitatea ajustatuz lortuko da. Solutuak ebanporatzeko 10 minutu utzi ostean, 1 mM DRP1 sub-fasera gehituko da aparatua duen zulo baten bitartez. Proteina gehituta ematen den gainazal presio aldaketa denboran zehar neurtuz joango da seinale egonkorra lortzen denerarte. Baldintza horien pean, DRP1en injekzioa lipido monogeruza baten absentsian gainazal presio maximo bat emango du zeina aztertutako lipido monogeruzen hasierako gainazal presioa baino baxuagoa den.

**DRP1 WT eta mutanteen adierazpenerako plasmidoen konstruktoak-** Giza DRP1en 1, 2 eta 3 isoformen konstruktoak pET29a bektorean klonatutako DRP1en ORFen (Dr. C. Blackstonek adeitasunez utzi zizkigunak, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, USA) anplifikazioz lortu dira hasle espezifikoak erabiliz (5'- GGA ATT C CAT ATG GAG GCG CTA ATT CCT GTC-3' eta 5'-GAA GGC TCT TCC GCA CCA AAG ATG AGT CTC CCG GA-3'). Ondoren PCR produktua errestrizio entzimen bidez (*NdeI/SapI*) moztu ostean aurretiaz linearizatutako pTYB1

bektorean ligatu da. Mutagenesia QuickChange Site-Directed Mutagenesis kita (Stratagene) erabiliz burutu da fabrikatzaileak emandako pausuak jarraituz. Mutagenesirako erabilitako hasleak hurrengoak dira: DRP1 K557-560A (5'-CTG GAG AGG AAT GCT GGC AAC TTC AGC AGC TGA AGA GTT ATT AGC-3' eta 5'-GCT AAT AAC TCT TCA GCT GCT GAA GTT GCC AGC ATT CCT CTC CAG-3') DRP1 K569-571A (5'-AGT TAT TAG CAG AAG AAG CAT CAG CAC CCA TTC CAA TTA T-3' eta 5'-ATA ATT GGA ATG GGT GCT GAT GCT TCT TCT GCT AAT AAC T-3'). DRP1 K557-560-569-571A arestian aipatutako bi hasle bikoteak sekuentzialki erabili dira. Mutazioak baieztatzeko konstruktoak sekuentziatzeraz bidali dira.

**GTPasa aktibitate neurketa-** DRP1en GTPasa akibitate malakita berdea esperimentu kolorimetrikoa erabiliz neurtu da (Leonard *et al.*, 2005). Laburki, 0.5 mM DRP1 1 mM GTPri gehitu eta 30 minutuz 30°C-tara inkubatzen da 100 ml tanpoitan (125 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.4, 1 mM GTP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>). Soluzio horren 10 ml 90 ml Malakita berde stock soluziora gehitzen zaizkio (500 mM Malakita berde, Sigma, 10 mM amonio molibdato 1N HCl-tan) eta absorbantzia 650 nm-tara neurtzen da. Oreka egoerako zinetiken analisirako, 0.5 mM DRP1 eta GTP kontzentrazio desberdinak (0, 125, 250, 500, 1000 eta 2000 mM) 30°C-tara inkubatu dira. 5 minuturo bolumen jakinak ateraz joan izan dira 60 minututan zehar, atera bezain laster absorbantzia 650 nm-tara neurtuz joan izan da. Hidrolisi tasa maximoa ( $V_{max}$ ) eta abiadura maximoaren erdia deneko sustrato kontzentrazioak ( $K_{0.5}$ ) SigmaPlot programa bidez kalkulatu dira erregresio ez linealaren kurbari doitu. Hiru aldiz errepikatu dira esperimentuak eta bakoitza hirukoiztuta egin da. Signifikantzia estatistikoa Student's t-test bidez balioetsi da.

**Dikroismo zirkularra (CD)-** CD espektroak 37°C-tar egin dira Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Spectroscopic Co. Ltd., Hachioji City, Japan) erabiliz, zeina Jasco PTC-423S tenperatura kontrolatzailea duen, eta 1 mm-ko pasu optikoa duen kubeta erabiliz. Datuak 0.2 nm-ro 50 nm/min-ra 260 nm-tik 198 nm-ra eta 2 nm-ko banda zabalerarekin jaso dira, emaitzak 20 eskaneoen batzbestekoak dira. DRP1 (1 mM) liposomekin (1 mM) KCl tanpoitan nahastu da. Lagin guztiak neurketak egin baino 30 minutu arinago orekatzen utzi izan zaie. Liposomen eta tanpoiaren kontribuzioa balio esperimental guztietatik kendu da. Eliptizitate molar balioak hurrengo adierazpena erabiliz neurtu dira:  $\{h\}=e/10cnl$ , non  $e$  eliptizitatea den,  $c$  proteina kontzentrazioa den (M),  $l$  kubetaren pasu optikoa, eta  $n$  proteinaren lotura peptidikoak diren.

**Tamainaren bidezko banaketa kromatografia-** DRP1 (1 mM) liposomekin (1 mM) KCl tanpoian nahastu eta 30 minutuz 37°C-tara inkubatu da. Liposomak ondoren %2 CHAPS-etan lisatu eta material solugaitza zentrifugazio bidez kendu da (100,000x g 30 min). Gainjalkina 25 mM Hepes, 200 mM NaCl, pH 7.5 1% CHAPS, 2 mM DTT tanpoitan orekatutako.Sephadex S200 (Amersham Pharmacia) zutabeen injekatu eta kromatografia 60 ml tanpoi eta 1 ml-ko frakzioak batuz burutu da. DRP1en banaketa western plapaketa bidez aztertu da.

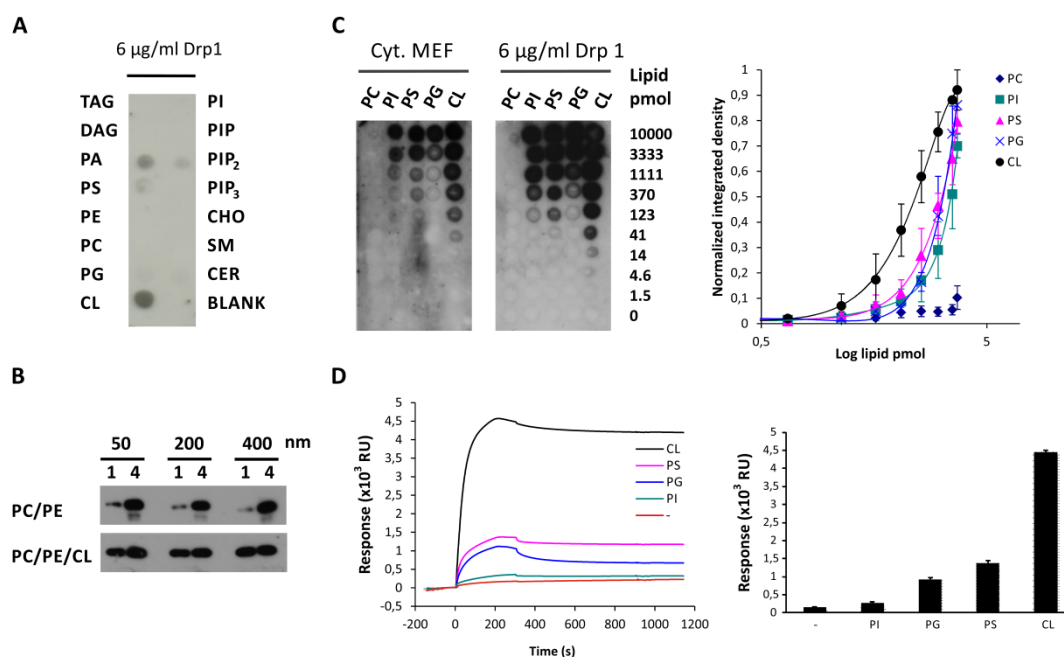
### 3.1.3 EMAITZAK

#### 3.1.3.1 DRP1ek CLrekin espezifikoki interakzionatzen du

CL mitokondrioko lipido bereizgarria da eta organuluaren lipido edukiaren ia %10 suposatzen du (van Meer *et al.*, 2008). Nahiz eta MIMean aurkitzen den batez ere, CL MOMean ere aurkitu daiteke, bere kontzentrazioa maximoa mintz kontaktu guneetan izanik (Ardail *et al.*, 1990). Horretaz gain, fisio mitokondrialaren areagotze batekin erlazionatutako zenbait gertaera fisiologikok, apoptosia (Liu *et al.*, 2008) edo mitofagia (Chu *et al.*, 2013) kasu, CLren MOMerako kanporaketa eragiten dute. Gainera, burututako beste ikerketek DRP1 CL-dun liposometara batu daitekeela proposatu da (Montessuit *et al.*, 2010). Interesgarria da, ebidentzia desberdinek iradokitzen dutela beste bi dinamina-moduko proteina mitokondrialek, Mgm1 (legamietan) eta OPA1 (ugaztunetan), CLrekin zuzenki interakzionatzen dutela, eta interakzio hauek proteina hauen funtzioaren erregulaziorako garrantzitsuak direla (Ban *et al.*, 2010; DeVay *et al.*, 2009; Rujiviphat *et al.*, 2009). Behaketa hauetan oinarrituz, DRP1:CL interakzioa zehaztasun handiagoz aztertzea erabaki genuen.

Lehendabizi, dot plapaketa burutu genuen zeinetan DRP1 birkonbinatua ugaztun zeluletako glizerolipido eta esfingolipido arruntenak dituen nitrozelulosa mintzekin inkubatu zen. Aztertutako lipido guztietatik, DRP1 CLrekin batzen zen irmoki (1A irudia), gutxiago fosfatidilserina (PS) eta azido fosfatidiko (PA) lipido anionikoekin eta era ez detektagarrian fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) lipido polianionikoarekin, nahiz eta lipido honek CLak baino karga neto negatiboagoa duen. Dosi-erantzun esperimientuek erakusten dute DRP1 birkonbinatua CLrekin 5 aldiz, 10 aldiz eta 18 aldiz potentzia handiagorekin batzen dela PS, PG eta PI-rekin baino (1C irudia). Gainera, MEF zeluletako DRP1 endogenoak ere fosfolipido anioniko desberdinak ezagutu eta CLrekiko antzeko preferentzia duela behatu dugu (1C irudia). Nitrozelulosa mintzean sakabanatutako fosfolipidoek bigeruzak lipidikorik eratzen ez dutela kontutan hartuz, DRP1:CL interakzioa CLak bigeruzaren ezaugarri fisikoetan eragindako aldaketen menpekoea ez dela iradokitzen dute, adibidez mintzeko lipidoen domeinuetan zeharreko albo-banatze edo mintzaren monogeruzaren kurbatura negatiboaren sorrerak eragindako estresaren menpekoea ez dela. Aspektu hau zehatzago aztertzeko, DRP1ek tamaina desberdineko PC/PE eta PC/PE/CL besikulekin duen interakzioa aztertu zen. DRP1 PC/PE besikuletara ia ez dela batzen behatu genuen, CL duten besikula guztietara aldiz oso antzeko moduan batzen zen, besikulen tamainak inongo eraginik izan gabe (1B irudia). Eraitza hauek DRP1 eta CL-dun liposomen arteko interakzioan mintzaren kurbatura intrintseko netoak eraginik ez duela iradokitzen dute.

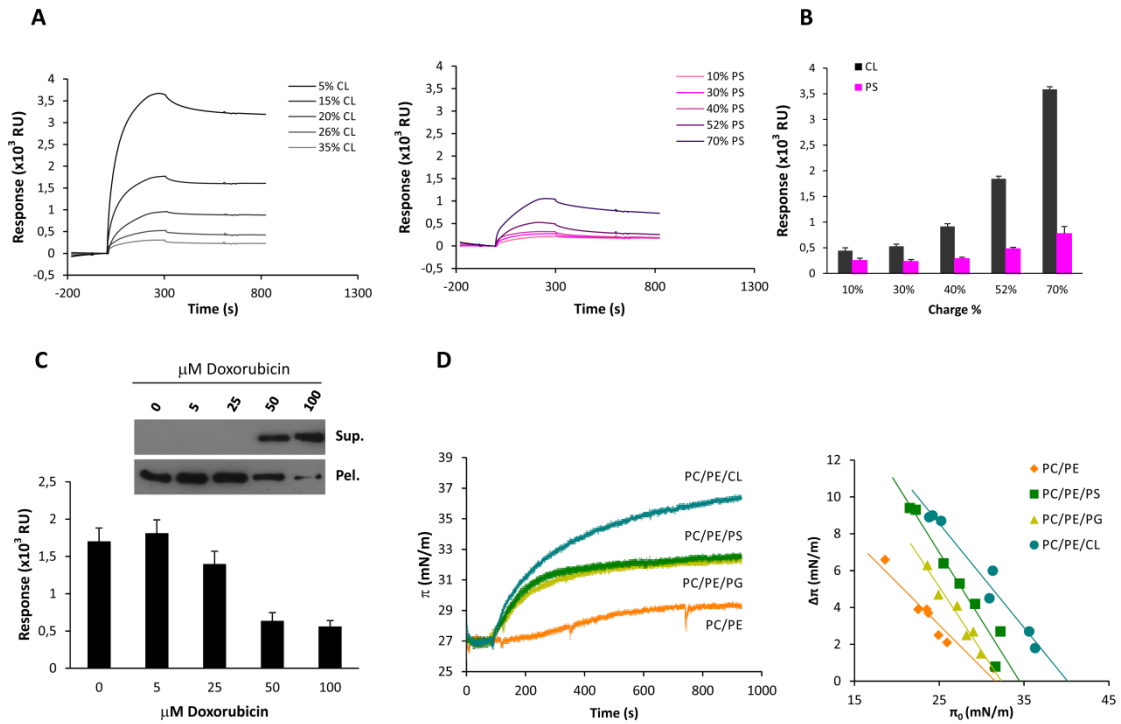
DRP1en lipido-batuketa ezaugarriak denbora errealean aztertzeko, gainazaleko plasmoin erresonantzia (SPR, ingelesetik *Surface Plasmon Resonance*) saiakerak egin genituen. Horretarako, konposaketa desberdineko liposomak L1 txiparen gainazalean atxikitu eta DRP1en batuketa zinetikak aztertzeko ligando bezala erabili genituen. SPR sensograma adierazgarriak 1D Irudian erakusten dira. Batuketa maximoa, CL duten LUVekin behatu zen, aldiz DRP1 ez zen zeroko karga netoa duten PC/PE LUVetara batu. Interesgarria da, CL beste lipido anionikoz ordezkatu zenean (PS, PI, PG), nahiz eta karga negatibo netoa mantentzen zen, ez ziren CL-rekin lortutako batuketa balioak lortu. Honek, DRP1:CL interakzioa indar elektrostatiko soilen menpekoa ez dela iradokitzen du.



**1 Irudia. DRP1 lipido anionikoekin interazionatzen du. A)** DRP1en batuketa erakusten duen lipido:proteina dot plaketa adierazgarri bat. Ugartun zeluletan arruntak diren glizerolipido eta esfingolipidoak dituzten nitrozulosa mintzak 6 mg/ml DRP1ekin (3 Isoforma) inkubatuak izan dira. TAG, triazilglizerol; DAG, diazilglizerol; PA, azido fosfatidikoa; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilkolina; PG, fosfatidilglizerol; CL, kardiolipina; PI, fosfatidilinositol; PIP, fosfatidilinositol-fosfato; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol bifosfato; PIP<sub>3</sub>, fosfatidilinositol trifosfato; CHO, kolesterol; SM, esfingomielina; CER, zeramida. **B)** DRP1en batuketa tamaina desberdineko liposometara sakarosa densitate gradientearen zentrifugazio ostean. DRP1 (1 mg) 37°C-tara 30 minutuz 200 mM liposomekin inkubatu izan da. Proteina/lipido nahastura (150 ml) 300 ml-tara diluitu izan da 2.4 M sakarosa duen tanpoiarekin eta zentrifuga tutu batera pasatu. Ondoren, erreakzio nahastura zentrifuga tutu batera pasatzen da. 2.4 M sakarosa geruzari, 0.8 M sakarosa duen 400 ml KCl tanpoia gehitzen zaio eta ondoren 0.5 M sakarosa duen 300 ml KCl tanpoi gehituko dira. Ondoren TLA-120.2 rotorean 400,000x g-tara 3 orduz 4°C-tara zentrifugatuko dira. 250 ml-ko lau frakzio jasoko dira azpitik (4 frakzioa) gora (1 frakzioa). Goiko frakzioak (1.frakzioa) liposomak ditu, rhodaminaren fluoreszentsiazatik ikusi daitezkeenak, azpiko

frakzioak (4. frakzioa) batu gabeko proteina izango du. Bi frakzio hauek SDS-PAGE eta Western plapaketa bidez aztertu izan dira. **C)** Dot plapaketa bidez aztertutako DRP1en lipidoekiko batuketaren analisi kuantitatiboa. Lipidoen kopuru desberdinak gaineratu izan zaizkio nitrozelulosako mintzari. Gero bai MEF zelulen zitosolen estraktuekin (Cyt. MEF) edo DRP1 birkonbinatuarekin (6 mg/ml) inkubatu izan dira. DRP1en immunoerreaktibilitatea puntu bakoitzean neurtu izan da, lipido bakoitzeko normalizatu eta datuak dosi-erantzun sigmoidal erregresio ez-lineal modelo bati doitu zaio Sigma Plot programa erabiliz. EC50 balioak CL, PS, PG eta PI-rentzat hurengoak dira hurrenez hurren, 217 pmol, 1091 pmol, 2259 pmol and 3917 pmol. Erakusten diren batazbesteko balioak  $\pm$ SEM hiru esperimentu independenteenak dira. **D)** DRP1 (0.6 mM) eta adierazten diren lipidoak dituzten atxikitutako LUVak dituzten L1 txipen arteko interakzioen azterketa gainazaleko plasmioen erresonantzia bidez (SPR). Ezkerreko panela: Batuketa eta disoziazio zinetika adierazgarriak erakusten dituzten sensogramak. Eskuineko panela: 3-5 esperimentu independentetan lortutako batuketa erantzunen laburpena, Liposomen konposaketa lipidikoa hurrengo izan zen (mol/mol): 80PC/20PE (-), 28PC/20PE/52PI (PI), 28PC/20PE/52PG (PG), 28PC/20PE/52PS (PS), eta 54PC/20PE/26CL (CL). Balioak gutxienez lau esperimentu indeendienteen batazbestekoak dira  $\pm$ SEM. DRP1en batuketa CL-dun liposometara \*\*\*: p,0.001 desberdintasuna du PS-dun liposometara duen batuketarekin alderatuz.

Ondoren, gero eta CL eta PS kontzentrazio handiagoak dituzten besikulen eta DRP1en arteko batuketa aztertu genuen. Aztertutako kontzentrazio guztietara, DRP1en batuketa txikiagoa izan zen PS-dun liposomen kasuan (2A, 2B irudiak). Tamalez, beste proteina:mintz interakzioetarako ere behatu den bezala, zinetika konstanteak ezin izan ziren lortu sensogramak lehenengo ordeneko batuketa eredu batera doitzuz (Bakrač *et al.*, 2008; Cocklin *et al.*, 2006; Landeta *et al.*, 2011). DRP1 eta CLren arteko interakzioaren espezifikotasuna ikertzeko, CLrekin interakzionatzen duen doxorribizinen efektua aztertu genuen. DRP1 CL duten liposomekin eta doxorubizina kontzentrazio desberdinekin inkubatu zen. Lipidorik gabeko eta lipidoa duten frakzioak zentrifugazio bidez banandu ziren gero. Liposometara-batutako DRP1 (jalkina, Pel. Ingelesetik *Pellet*) eta DRP1 askea (gainjalkina, Sup. Ingelesetik *supernatant*) SDS-PAGE eta western plapaketa bidez aztertu izan ziren (2C irudia, goiko panela). Datu hauek argi erakusten dute doxorribizinen kontzentrazioaren handipenak, DRP1en batuketa CL duten liposometara eragozten dutela. Emaitza hauek SPR bidez baieztatu ziren (2C irudia, beheko panela).



**2 Irudia. Beste lipido anionikoekin konparatuz, DRP1 lehentasunez CLri batzen saio. A)** DRP1 (0.3 mM) handituz doazen CL edo PS kontzentrazioak dituzten liposomekin duen interakzioaren sensograma adierazgarriak. Liposomek hurrengo konposaketa lipidikoa daukate: 75PC/20PE/5CL (%5 CL), 65PC/20PE/15CL (%15 CL), 60PC/20PE/20CL (%20 CL), 54PC/20PE/26CL (%26 CL), 45PC/20PE/35CL (%35 CL) and 70PC/20PE/10PS (%10 PS), 50PC/ 20PE/30PS (%30 PS), 40PC/20PE/40PS (%40 PS), 28PC/20PE/52PS (%52 PS), 10PC/20PE/70PS (%70 PS). **B)** DRP1 (0.3 mM) CL eta PS duten liposomekin batzeko erantzunen laburpena. Zutabe bakoitza gutxienez hiru esperimendu independenteen batazbesteko balioa adierazten du  $\pm$ SEM. **C)** Goiko panela: DRP1 (1 mM) izoztu/desioztutako 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomekin inkubatu zen doxorubizinarene kontzentrazio desberdinatara. Liposomak zentrifugazio bidez sedimentatu ziren tea jalkin (oel) eta gainjalkinak (Sup) DRP1en presentzia baieztatzeko western plapaketa bidez aztertu ziren. Western plapaketa hiru esperimendu independenteen adierazgarri da. Beheko panela: Doxorubizinarene kontzentrazioa handituz, DRP1ek (0.3 mM) duen batuketa erantzunak. Liposomen konposaketa lipidikoa hurrengo izan zen: 54PC/20PE/26CL (mol/mol). Hiru esperimendu independenteen batazbesteko balioak  $\pm$ SEM erakusten dira. **D)** Ezkerreko panela: gainazal presio aldaketak ( $\pi$ ) DRP1 hurrengo konposaketa lipidikoa duten monogeruzetan: 80PC/20PE, 28PC/ 20PE/52PS, 28PC/20PE/52PG edo 54PC/20PE/26CL. Geziak proteina gehitu den momentua adierazten du. Eskuineko panela: gainazal presioan emandako aldaketak ( $\Delta\pi$ ) hasierako gainazal presioaren arabera neurtu zen ( $\pi_0$ ). Datuak lerro zuzen batera doitu dira, x-ardatzeko mozketak puntua monogeruzaren eskusio presioa da ( $\pi_c$ ), zeina mintzaren barneratze neurria den.  $\pi_c$  balioak 31.61 mN/m PC/PE-rentzat, 32.25 mN/m PC/PE/PG-rentzat, 34.45 mN/m PC/PE/PS-rentzat eta 40.12 mN/m PC/ PE/CL-rentzat dira.



Ondoren, DRP1ek lipido monogeruzekin duen elkarrekintza aztertu genuen Lagmuir balantza bat erabilita. Hurrengo konposaketa lipidikoak dituzten monogeruzak 80PC/ 20PE, 28PC/20PE/52PG, 28PC/20PE/52PS edo 54PC/20PE/ 26CL gainazal azalera konstante eta 28 mN/m-ko hasierako gainazal presioarekin prestatu ziren. DRP1 birkonbinatua azpifasera gehitu eta monogeruzaren gainazal presioan emandako aldaketak denboran zehar neurtu ziren. 2D irudian erakusten den bezala, PS, PG edo CL duten monogeruzen gainazal presioa handituz hasten da proteina gehitu orduko, aldiz neutroak diren PC/PE monogeruzetan lag fase bat ematen da. Eraitza hauek erakusten dute DRP1en asoziazioa lipido monogeruzetara osagai elektrostatikoa baduela. Ez hori bakarrik, nahiz eta karga elektriko netoa bera den, DRP1ek askoz gainazal presio handipen handiagoa eragiten du CL duten monogeruzetan PG edo PS duten monogeruzekin alderatuz (2D irudia). Honek iradokitzen du CLren beste ezaugarri batzuek ere DRP1ekiko interakzioan parte hartzen dutela. DRP1ek lipido monogeruzetan barneratzeko duen gaitasuna kuantifikatzeko, gainazal presio kritikoa kalkulatu zen. Esperimentu horietan, DRP1 gehitzean gainazal presioan hasierako gainazal presioarekiko ( $\pi_0$ ) ematen den handipena ( $\Delta\pi$ ) neurtu zen. Datuak lerro zuzen batera doitu eta zuzenaren ebaki puntua x-ardatzean monogeruzaren gainazal presio kritikoa izango da ( $\pi_c$ ). 2D irudian agertzen diren emaitzek erakusten dute DRP1en barneraketa gaitasun maximoa CL-dun monogeruzetan ematen dela eta minimoa PC/PE monogeruzetan, PG eta PS-dun monogeruzek aldiz bitarteko balioak erakusten dituzte.

Laburbilduz, hiru lipido interakzio esperimentu idenpendienteak erabiliz (dot plapaketa, SPR eta lipido monogeruzen gainazal presioaren neurketa) lortutako emaitzak kontutan hartuz, DRP1 lehenetsunez CL-dun mintzekin interakzionatzen duela esan genezake.

### **3.1.3.2 DRP1en B Intsertoaren bidez ematen da CLrekiko interakzioa**

Dinamietan, PH domeinuak hurrengo funtzioak betetzen ditu: (i) proteinaren fosfoinositidodun mintzekiko batuketa gidatzen du, (ii) fosfoinositidoen taldekatzean bitartekari lana egiten du, eta (iii) mintz asoziazio honen bidezko GTPasa aktibitatearen erregulazioa koordinatzen du (Chappie *et al.*, 2010; Stowell *et al.*, 1999). Dinaminekin-erlazionatutako DRP1 proteinak ez du PH domeinurik eta B intsertoak proteinaren aktibitatean duen papera ezezaguna da. Berriki, legamien DNM1 proteinaren B intsertoak MDV1 proteina adaptatzailearekin asoziatzeko beharrezkoa den motibo laburra duela erakutsi da (Bui *et al.*, 2012). Hala ere, motibo hau hertsiki kontserbatuta dago ondoetan bakarrik eta gainera, MDV1 ortologorik ez da aurkitu ez euli, ez zizare ezta ornodunetan ere. B intsertoak egitura sekundariorik ez duela auresanda dago eta baita PH domeinuak bezala, mintzarekin interakzionatzen duen gunea izan daitekeela ere proposatu da (Fröhlich *et al.*, 2013; Mears *et al.*, 2011). Hala ere, hipotesi honen aurka B

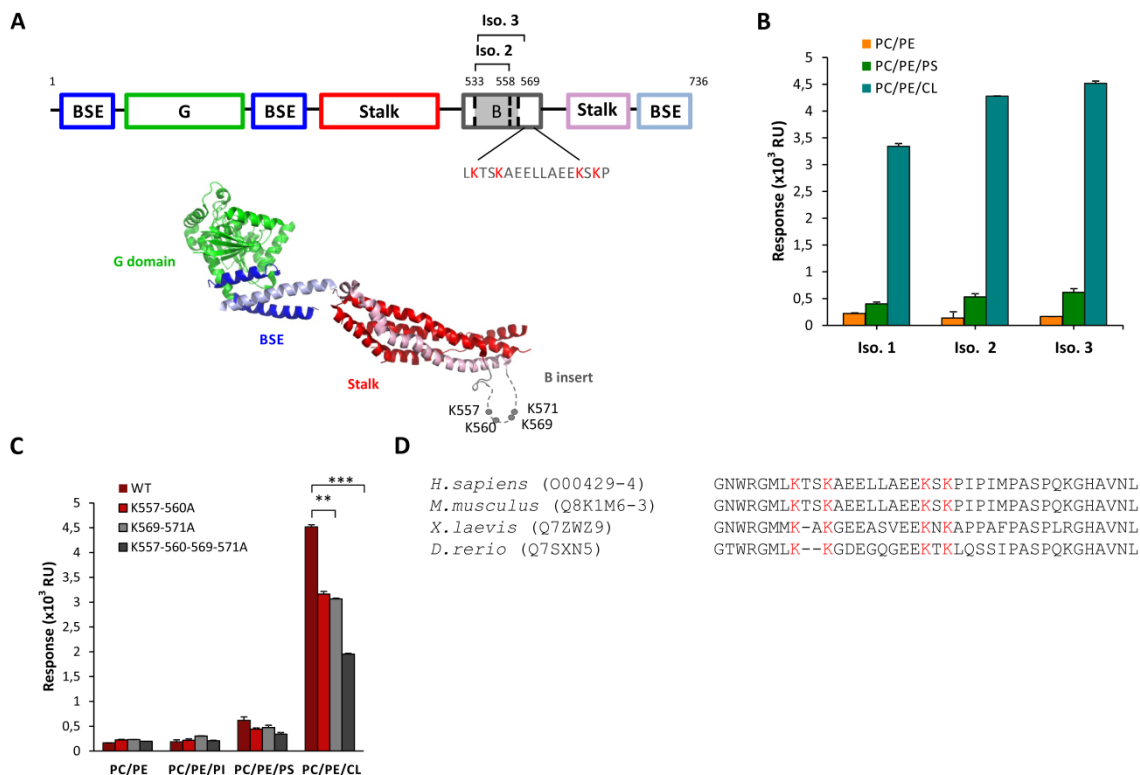
intsertoaren funtzioa proteinaren oligomerizazioa alosterikoki modulatzeko izan daitekeela iradokitu da (Strack & Cribbs, 2012).

B intsertoak DRP1:CL interakzioan duen papera aztertzeko, B intsertoaren luzeran desberdintzen diren hiru isoforma natural ekoiztu ditugu: 1 Isoforma, 736 hondar dituen proteina da; 2 Isoforma, B intsertoan 26 hondar falta dituen proteina; eta 3 isoforma, B intsertoan 37 hondar gutxiago dituen proteina (3A irudia). Hiru isoformek dimero eta tetramero nahastura bezala eluitzen dute gel filtrazio ostean eta proteina kontaminatzaile ez dute erakusten.

Lehendabizi hiru isoformen lipido batuketa patroiak aztertu genituen SPR bidez. Horretarako, hurrengo konposaketa lipidikoa duten liposomak prestatu ziren 80PC/20PE, 28PC/20PE/52PS eta 54PC/20PE/26CL. Hiru isoformek lehentasunez lipido anionikoekin interakzionatu zuten, nahiz eta guztiek afinitate handiagoa erakutsi zuten CL-dun liposomentzat. 3 isoformetarik, 3 isoformak CL batzeko gaitasun handiagoa erakusten du, gero 2 isoforma eta gaitasun txikiena 1 isoformak du (3B irudia).

DRP1en isoforma guztietan dagoen B intsertoaren gunea SUMOilatuak izan daitezkeen bi lisina bikote ditu (K557/K560 eta K569/K571 3 isoformarako), eta proteinaren aktibitate zikloarekin erlazionatua izan da SUMOilazio prozesu hau (Figuroa-Romero *et al.*, 2009). Beraz, 3 isoformaren B intsertoak funtsean bakarrik lisinak dituen gunea du (3A irudia). Hiru isoformek CL batzeko antzeko gaitasuna erakutsi zuten, B intsertoaren CLrekin interakzionatzeko duen trebetasuna SUMOilatuak izan daitezkeen lisina hauen menpekoea den aztertzea erabaki genuen. Hau aztertzeko, 3 isoformako lau lisinak 4 alanina hondarrez ordezkatu genituen (4KA mutantea) eta mutante honek lipido desberdinak batzeko duen gaitasuna ikertu genuen. SPR emaitzek erakusten dutenez (3C irudia) 4KA mutanteak CL-dun mintzak batzeko ahalmena nabarmenki gutxitua du. Ondoren, bi hondar bikote desberdinen ekarpena zein den aztertu genuen, 4KA mutantean lisinak binaka berreskuratuz. Bai K557/560 zein K569/571 berreskuratuz DRP1en CLrekiko batuketa partzialki berreskuratzen da, lau lisinak DRP1:CL interakzioan inplikaturik daudela iradokituz (3C irudia). B intsertoaren amino azido sekuentzien lerrokaketa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) erabilita egin zen, DRP1:CL interakzioan arduradunak diren lau lisinak ornodun guztiek elkarbanatzen dituztela behatuz (3D irudia).

Laburbilduz, gure emaitzek, B intserto dinaminen PH domeinua kokatzen den gunea baliokidean kokatzen dela eta Mgm1 eta OPA1en CL-interakzio hondarren gunea berean dagoela kontutan hartuz (Ban *et al.*, 2010; Rujiviphat *et al.*, 2009), B intserto CLrekin interakzionatzeko gunea dela proposatzen dugu.

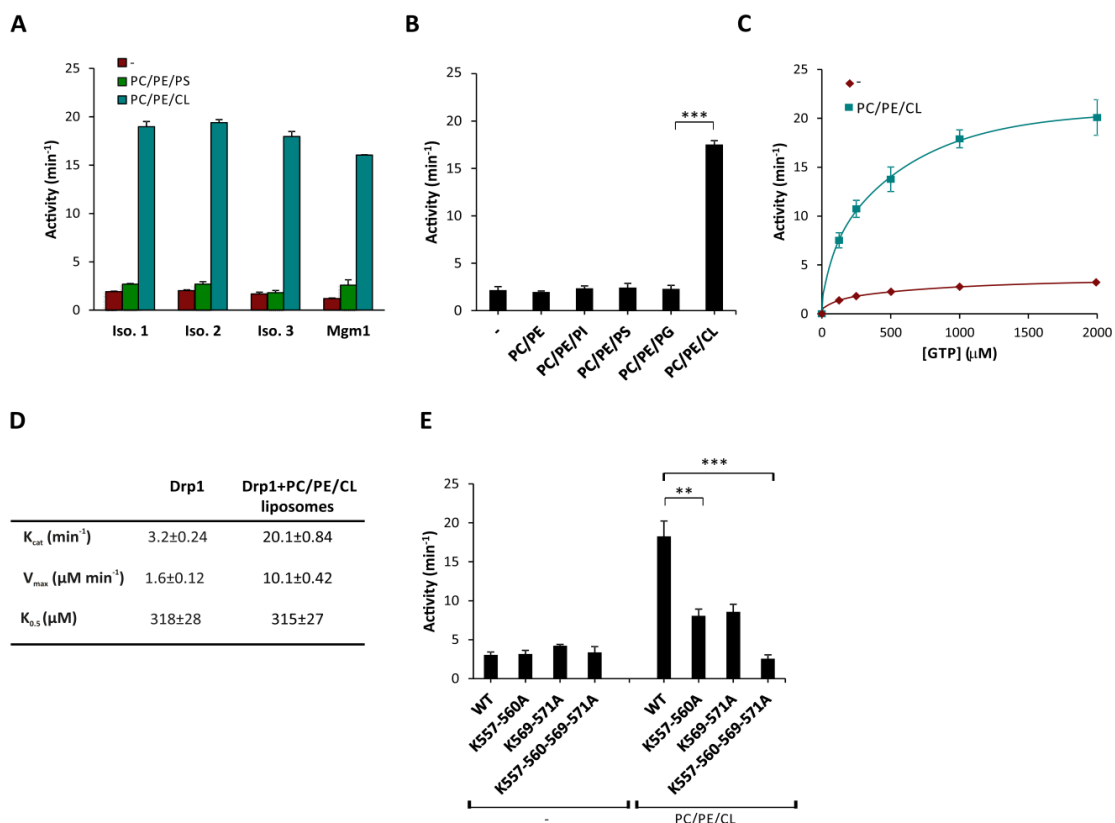


**3 irudia. B insertoa DRP1ek CLrekin interakzionatzeko beharrezkoa da. A)** Goiko panela: DRP1en egituraren oinarritutako domeinuen antolakuntzaren irudikapen eskematikoa. Beheko panela: DRP1en 3 isoformaren irudikapena, G domeinua (berdez), BSE (urdinez), B insertoa (grisez) eta txortena (gorriz) erakusten dituena. (Protein Data Bank 4BEJ kodea). Alaninara mutaturako lisina hondarrak irudikatuta daude (borobil grisak). **B)** DRP1 isoforma guztien (bakoitza 0.6 mM) SPR bidez lortutako batuketa erantzunak hurrengo konposaketa lipidikoekin 80PC/20PE, 28PC/20PE/52PS eta 54PC/20PE/26CL (mol/mol). Batzbesteko balioak  $\pm$ SEM hiru esperimentu independenteen emaitzak kontutan hartuz lortu dira. **C)** 3 isoformarekin lortutako batuketa erantzunak eta baita 3 isoformaren mutanteekin lortutakoak ere, K557-560A, K569-571A eta K557-560-569-571A. Liposomen konposaketa lipidikoa hurrengo izan zen: 80PC/20PE (-), 28PC/20PE/52PI (PI), 28PC/20PE/52PS (PS), 28PC/20PE/52PG (PG), eta 54PC/20PE/26CL (CL) (mol/mol). Hiru esperimentu independenteetatik lortutako batzbesteko balioak  $\pm$ SEM erakusten dira \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **D)** B insertoaren 550-558 hondarrak biltzen dituen gunearen amino azidoen sekuentzien lerrokaketa. Giza DRP1en 3 isoforma, *M. musculus*, *X. laevis*, eta *D. rerio* espezieen DRP1, Clustal Omega erabiliz eta eskuz egindako doikuntzekin. DRP1:CL interakzioaren arduradun diren lisinak gorri markatuta daude.

### 3.1.3.3 DRP1ek CLrekin duen elkarrekintzak proteinaren GTPasa aktibitatea areagotzen du

Dinamina, OPA1 eta Mgm1 isoforma laburraren GTPasa aktibitateak handitzen direla erakutsi izan da, proteinek lipido polianionikoak dituzten mintzetan oligomeroak eratzten dituztenean (Ban *et al.*, 2010; Chappie *et al.*, 2010; Heymann & Hinshaw, 2009; Lemmon, 2013; Rujiviphat *et*

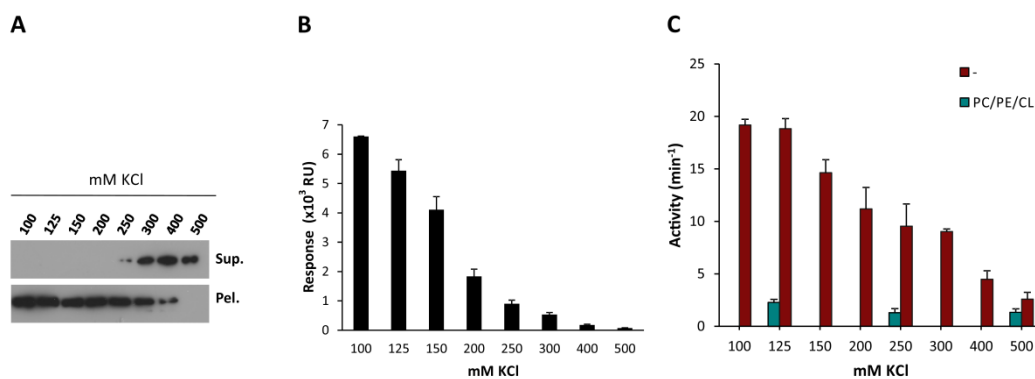
*al.*, 2009; Stowell *et al.*, 1999). Ondorioz, fosfolipido desberdinek DRP1en GTPasa aktibitatean duten eragina aztertu nahi izan dugu. DRP1 CL-dun liposomekin inkubatuz GTParen hidrolisia areagotzen da hiru isoforma desberdinetan ia maila bereraino (4A irudia). CLak Mgm1en GTPasa aktibitatea ere areagotzen du (4A irudia), aldez aurretik erakutsitako datuekin bat datorrena (DeVay *et al.*, 2009; Rujiviphat *et al.*, 2009). PS-dun besikulekin ordea, nahiz eta karga negatibo neto bera izan, ez da GTPasa aktibitate basala areagotzen aztertutako hiru isoformentzat (4A irudia). Fosfolipido anionikoen eragina hobeto karakterizatzeko, PC/PE liposomak gehi PI, PS, PG edo CL prestatu genituen, 4 irudiko testuan azaltzen den bezala. Probatutako lipidoetatik, GTP hidrolisia bakarrik CLak areagotzen duela behatu genuen (4B, 4C eta 4D irudiak). Fröhlich C. *et al.* (Fröhlich *et al.*, 2013) erakutsi zuten DRP1en GTP hidrolisi abiadura 10 aldiz areagotu daitekeela %100 PS-dun liposomekin. Guk ez dugu %100 PS liposomek DRP1en GTPasa aktibitatea areagotu dezaketen aztertu. Guk hemen kontzentrazio fisiologikoagoetara, CL PS baino efizienteagoa dela DRP1en aktibitatea areagotzen erakusten dugu. Hala ere, zenbait baldintza esperimentaletan, MgCl<sub>2</sub> kontzentrazio baxuetara adibidez, PS DRP1en aktibatzaile indartsua izan daitekeela ez dugu baztertzeko. DRP1 bakarrik eta DRP1 CLren presentzian lortutako K<sub>0.5</sub> balioak funtsean berdinak dira (4D irudia) DRP1ek GTPrentzat bi baldintzetan antzeko afinitatea duela erakusten duena. Hala ere, CL-dun liposomek GTP hidrolisiaren abiadura 6 aldiz handitzen dute (4C eta 4D irudiak). Garrantzitsua da azpimarratzea DRP1 beste fosfolipido anionikoak batu ditzakeen arren, soilik CL dela DRP1en GTPasa aktibitatea areagotzeko gai. Fenomeno honetan informazio gehiago lortzeko, DRP1en lipido batuketan eta GTP hidrolisi tasan indar ionikoak duen efektua aztertu genuen. Tanpoiaren gatz kontzentrazioaren handipen gradualak DRP1en batura CL-dun liposometara gutxitzen du, bai sedimentazioz bai SPRz behatu dezakegun moduan (5A eta 5B irudiak). DRP1:CL interakzioaren gutxipena DRP1en GTPasa aktibitatearen murrizpenarekin bat dator (5C irudia).



**4 Irudia. CLak DRP1en GTPasa aktibitatea areagotzen du. A)** DRP1en 1, 2 eta 3 isoformen eta Mgm1en (0.5 mM bakoitza) GTPasa aktibitateak soluzioan eta 80PC/20PE, 28PC/20PE/52PS edo 54PC/20PE/26CL (mol/mol) (0.5 mM) liposomen presentzian. Balioak hiru esperimentu independenteen batzbestekoak dira ± SEM. **B)** DRP1 3 isoformaren GTP-hidrolisi aktibitatea. DRP1en GTPasa aktibitatea 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomekin 28PC/20PE/52PG (mol/mol) liposomekin alderatuz desberdina da \*\*\*: p,0.001-rekin. Batzbesteko balioak ±SEM 3-7 esperimentu independenteen emaitzetatik lortutakoak dira. **C)** DRP1en (0.5 mM) oreka egoerako GTP hidrolisi zinetikak 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomen absentzian edo presentzian neurtuak. Balioak 3-5 esperimentu independenteen batzbestekoak ±SEM dira. **D)** DRP1en zinetika parametroak erakusten dituen taula. Ordezkapen zenbakia ( $k_{cat}$ ), erreakzioaren abiadura maximoa ( $V_{max}$ ), eta abiadura maximoaren erdia deneko sustratoaren kontzentrazioa ( $K_{0.5}$ ). Balioak 4-6 esperimentu independenteen batzbestekoak ±SEM dira. **E)** DRP1en 3 isoforma eta B intsertoaren lisina mutanteen GTP hidrolisi aktibitatea. Erreakzioak soluzioan CL-dun besikulen absentzian (-) edo presentzian (PC/PE/CL) eman dira. Balioak hiru esperimentu independenteen batzbestekoak ±SEM dira \*\*p,0.01, \*\*\*p, 0.001.

Orain arte erakutsitako emaitzek DRP1en CLrekiko batuketa espezifikoa bere GTPasa aktibitatea areagotzeko ezinbestekoa dela adierazten dutenez, B intsertoko mutazioek CLaren menpeko GTP hidrolisian duten eragina aztertu dugu. Arestian aipatu den bezala (3C irudia), 4KA mutanteak CLrekin interakzionatzeko gaitasun murriztua dauka. Mutante honek CL-dun liposomen absentzian zein presentzian duen GTPasa aktibitatearen azterketak erakusten du CLrekiko duen afinitate murriztuak CL-dun liposomek bere GTPasa aktibitatea areagotzeko duten gaitasun murriztuarekin bat datorrela (4E irudia). Garrantzitsua da aipatzea, 4KA

mutantearen GTPasa aktibitate basala ez dagoela kalteturik. Lisina bikote bakoitzaren berreskurapenak (K557/560 edo K569/ 571) CLak estimulatutako GTPasa hidrolisiaren berreskurapen partziala dakar, nahiz eta WT proteinarekin lortutako baliorik ez den lortzen bietako kasu batean ere ez (4E irudia). Datu hauetan oinarrituz, B intsertoan kokatzen diren lau lisinek DRP1en lipido asoziazio eta GTPasaren areagotzean parte hartzen dutela ondoriozta dezakegu. Gure behaketekin bat etorritz, berriki erakutsi da B intsertoa faltan duen DRP1 proteina mutantea lipido anionikoak dituzten liposomekin inkubatzekoan ez dela inongo GTP hidrolisi handipenik ematen (Fröhlich *et al.*, 2013). Laburbilduz, gure emaitzek irmoki iradokitzen dute DRP1en B intsertoak CLrekin duen interakzioa DRP1en aktibazio funtzionalarekin estuki lotuta dagoela. Gure aurkikuntzekin alderatuz, Strack eta Cribbs-ek behatu zuten B intsertoa mitokondriara batzeko, MFFrekin asoziatzeko eta protonoforoek-eragindako fisio mitokondrialarentzako ezinbestekoa dela (Strack & Cribbs, 2012). Zentzu honetan, DRP1en batuketa mintzera eta aktibazio mekanismoak kontextu zelularren arabera desberdinak izatea posiblea da. CLren menpeko DRP1 batuketa eta aktibazioa CL MIMetik MOMera pasatzen deneko prozesuetan garrantzitsua izan daiteke, apoptosia eta mitofagian esaterako (Chu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2008).



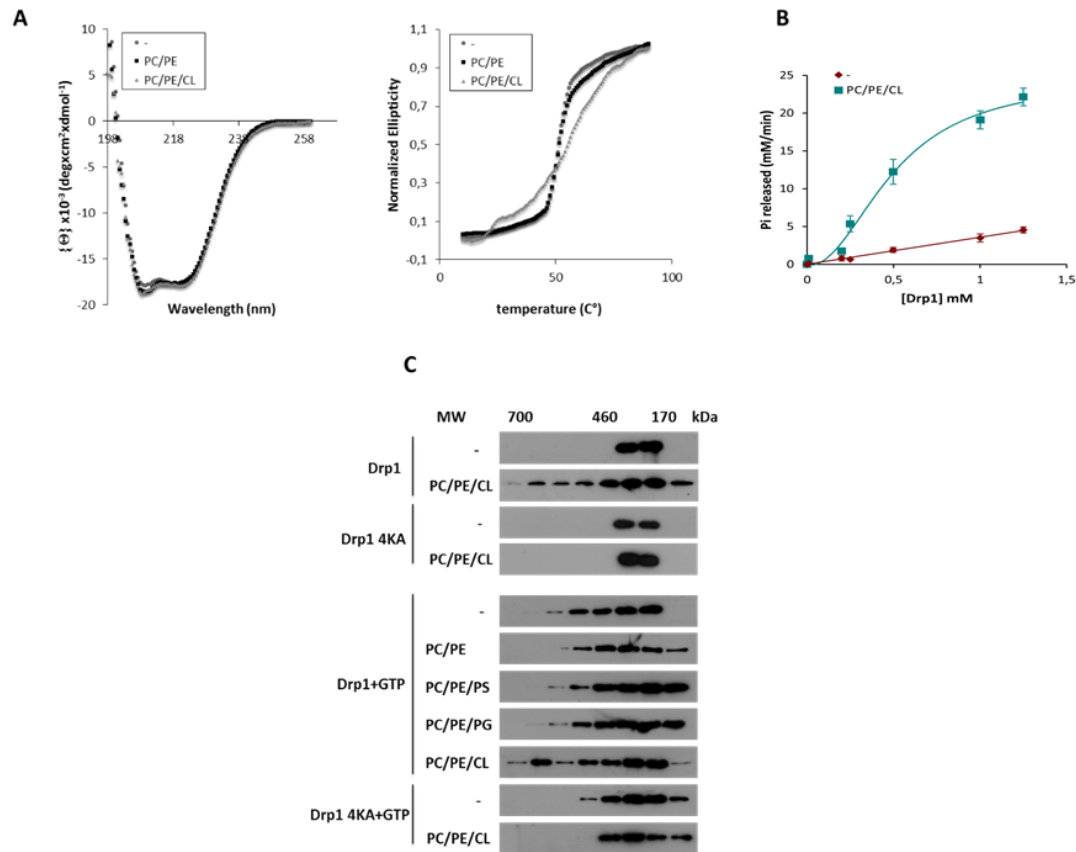
**5 Irudia. Indar ionikoaren handipenak DRP1en batuketa CLra kaltetzen du. A)** Lipido kosedimentazio esperimenteran DRP1 (1 mM) 30 minutuz 54PC/20PE/26CL (mol/mol) konposaketa duten izoztu/desioztutako liposomekin inkubatu da handituz doan KCl kontzentrazioarekin. Abiadura baxuko zentrifugazioa burutzen da jarraian eta DRP1en presentzia western plapaketa baten bidez aztertzen da, bai liposomarik gabeko (Sup.) zein liposomak dituen (Pel.) frakzioetan anti-DRP1 antigorputz monoklonala erabiliz. **B)** DRP1en (0.6 mM) SPR analisiak 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomen presentzian eta handituz doan KCl-ren presentzian. Barra bakoitzak gutxienez hiru esperimentu independenteen batzabestekoa  $\pm$ SEM adierazten du. **C)** DRP1en 3 isoformaren GTP hidrolisi aktibitatea. DRP1en GTPasa aktibitatea soluzioan eta 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomen presentzian neurtu izan da geroz eta handiagoak diren KClren kontzentrazioen presentzian. Balioak hiru esperimentu independenteen batzabestekoak  $\pm$ SEM dira.

### 3.1.3.4 DRP1 CL-dun liposometan oligomerizatzen da

Dinamina klasikoetan, lipidoek eragindako oligomerizazioaren ondorioz GTPasa aktibitatearen handipen bat ematen da (Kenniston & Lemmon, 2010; Mears & Hinshaw, 2008). Fenomeno berdina, dinamina-moduko zenbait proteinentzat ere deskribatu delarik (DeVay *et al.*, 2009; Rujiviphat *et al.*, 2009). Ondorioz, CLrekin interakzionatu ostean DRP1en eman daitezkeen egitura aldaketak aztertzea erabaki genuen. DRP1 bakarrik zein CL-dun edo CLrik gabeko liposomen presentzian ematen den urruneko-UM CD espektroek proteinaren egitura sekundarioan aldaketa minimoak erakusten dituzte (6A irudiak). CD-Pro programa erabilia,  $\alpha$ -helize eta  $\beta$ -orri edukiak kalkulatu ziren.  $52.95 \pm 1.7\%$  eta  $10.79 \pm 2.67\%$  direlarik soluzioan dagoen proteinentzat hurrenez hurren;  $55.85 \pm 2.17\%$  eta  $8.57 \pm 4.39$  PC/PE besikulen presentzian eta  $54.31 \pm 4.17\%$  eta  $11.15 \pm 4.07\%$  PC/PE/CL besikulen presentzian. Balio hauek X-izpien difrakzio bidez lortutakoekin bat datoz (Fröhlich *et al.*, 2013). Beraz, DRP1 baldintza guztietan ondo tolestuta dagoela eta proteinaren egitura sekundarioa ez dela nabarmenki aldatzen besikulen presentzian ondoriozta dezakegu.

DRP1en egitura tertziario edo kuarternarioan eman daitezkeen aldaketak aztertzeko, proteinaren desnaturalizazio termikoa jarraitu genuen 222nm-tara CD bidez. DRP1ek soluzioan kurba sigmoidala erakusten du eta 50°C gainera oso azkar destolesten hasten da. Aldiz, CL-dun liposomak gehitzean desnaturalizazio prozesuaren kooperatibitatea murrizten da. Honek iradokitzen du DRP1 konformazio desberdinak hartzeko gai dela eta CLrekin emandako interakzioak proteinaren egonkortasunean handipen bat eragiten duela.

Dinaminen ikerkuntzatik proteina hauen oligomerizazioak euren egoera funtzionala erregulatzen paper garrantzitsua jokaten duela atera daitezkeen ondorio bat da (Chappie *et al.*, 2010; Stowell *et al.*, 1999). Aldez aurretik erakutsi da dinaminen GTPasaren aktibitatearen areagotzea oso kooperatiboa dela PIP<sub>2</sub>-dun besikulen presentzian, zeina dinaminen oligomerizazioa eragiten duen (Chappie *et al.*, 2010; Stowell *et al.*, 1999). Ondorioz, DRP1en kontzentrazioak GTPasa aktibitatean duen eragina aztertu dugu, bai soluzioan zein CL-dun liposomen presentzian ere. DRP1en hidrolisi tasa proteina kontzentrazioa handitzen doan heinean modu linealean handitzen den bitartean, hidrolisi tasa modu sigmoidalean handitzen da CL-dun liposomen presentzian, kooperatibitate positiboa erakutsiz (6B irudia). Beraz datu hauek iradokitzen dute DRP1en GTPasa aktibitatea CL-dun liposometan ematen den oligomerizazioak areagotzen duela.



**6 Irudia. CLrekiko interakzioak DRP1en oligomerizazioa dakar. A)** Ezkerreko panela: DRP1en urruneko-UM CD espektrua adierazgarria, 80PC/20PE edo 54PC/20PE/26CL (mol/mol).konposizioa duten liposomen absentsian (-) edo presentzian. Eskuineko panela: 222nm-tara neurtutako DRP1en desnaturalizazio termikoko kurbak 80PC/20PE edo 54PC/20PE/26CL (mol/mol).konposizioa duten liposomen absentsian (-) edo presentzian. Eliptizitate balioak normalizatuak izan ziren DRP1en desnaturalizazio tasak besikulen absentsian zein presentzian konparatzeko. DRP1 eta SUV kontzentrazioak 1mM eta 1 mM dira, hurrenez hurren. **B)** GTP hidrolisia malakita berdea esperimendu kolorimetrikoa erabiliz neurtu da Materialak eta Metodoak atalean azaltzen den bezala. Handituz doazen DRP1 kontzentrazioak 54PC/20PE/26CL (mol/mol) liposomen (400 mM) absentsian ( $\diamond$ ) edo presentzian( $\blacksquare$ ) eta 1 mM GTPekin 37°C-tara inkubatu izan dira. DRP1ek soluzioan duen GTPasa aktibitatea bere kontzentrazioarekiko linealki proportzionala da, aldiz, PC/PE/CL liposomen presentzian DRP1ek portaera sigmoidala erakusten du. Balioak 2-4 esperimendu independenteen batzbestekoak  $\pm$ SEM dira. **C)** DRP1 WT eta 4KA mutantearen gel-filtrazio analisiak Sephadex S200 zutabea erabilita. DRP1 (1 mM) GTPekin (1 mM) edo gabe eta liposomekin (1 mM) 4 mM  $\text{MgCl}_2$  duen KCl tanpoian 30 minutuz eta 37°C.tara inkubatu zen. Adierazitako laginak %2 CHAPS (w/v)ekin tratatu eta 1% CHAPS (w/v) duen KCl tanpoian orekatutako zutabean injektatu ziren. Frakzioak jaso eta SDS-PAGE eta western-plapaketa bidez aztertu ziren, anti-DRP1 antigorputz monoklonala erabiliz. Liposomen konposaketa hurrengoa da: 28PC/20PE/52PI, 28PC/20PE/52PS, 28PC/20PE/52PG, eta 54PC/20PE/26CL (CL) (mol/mol).

Ondoren DRP1 WT eta 4KA mutantearen oligomerizazioa aztertu genuen baldintza desberdinetan, tamainaren menpeko banatze kromatografia bidez. DRP1 proteina GTPekin edo



gabe, eta lipido konposaketa desberdineko liposomen absentsian edo presentzian inkubatu zen. Lipido besikulak %2 CHAPSarekin solubilizatu ziren gero eta tamainaren menpeko banatze kromatografia bidez frakzionatu ziren ondoren (6C irudia). GTPa bera bakarrik DRP1 WT eta 4KA mutantearen oligomerizazioa eragiteko gai dela aurkitu dugu. PC/PE/CL besikulen presentzian, DRP1 WT 700 KDa-eko masa izango lukeen frakzioan eluitzen da baita GTPren absentsian ere. Aldiz, DRP1 4KA mutantearen eluzio profila aldatu gabe mantentzen da. PC/PE, PC/PE/PS edo PC/PE/PG besikulen gehiketak ez du DRP1 WT proteinaren eluzio profila aldatzen. Beraz, ondoriozta dezakegu CLrekin ematen den interakzioa DRP1 pisu molekular handietan antolatzea eragiten duela.

### 3.1.4 EZTABAIDA

Kardiolipina zenbait mintz proteina periferikoentzat mintz aingura bezala deskribatu izan da, c-zitokromo (Rytomaa & Kinnunen, 1995; Sinibaldi *et al.*, 2013), kaspasa 8 (Gonzalez *et al.*, 2008) eta ebakitako Bid (Gonzalez *et al.*, 2010) proteinentzat besteak beste. Mintz ainguratzat funtzionatzeaz gain, CLrekin interakzioak proteinaren funtzioa ere erregula dezake. Lan honetan, CL eta DRP1 proteinaren arteko interakzio fisiko eta funtzionala bermatzen duten zenbait aurkikuntza berri deskribatu ditugu. Lehendabizi, DRP1en hiru isoformek, zeintzuk B intsertoaren luzeran desberdintzatzen diren, fosfolipido anioniko guztietatik lehentasunez CLri batzen direla frogatu dugu. Gainera, DRP1 birkonbinatuaren kasuan ez ezik, MEF zeluletatik isolatutako DRP1 endogenoak ere lehentasunezko batuketa hori erakusten duela behatu dugu. Bigarrenik, B intsertoa CLrekin ematen den interakzioaren arduraduna dela aurkitu dugu. Nahiz eta proteina asko CLrekin interakzionatzen duten, interakzioa baimentzen duten motibo espezifikokoak nekez aurkitu dira (Gonzalez *et al.*, 2010). Dinaminen superfamilia osatzen duten proteinak bi azpitaldeetan bana daitezke, (i) dinaminak, eta (ii) dinamina-moduko proteinak. Dinaminetan, PH domeinua txortenen puntan kokatzen da eta PIP<sub>2</sub> lipidoarekin ematen den interakzioaren arduraduna da. Dinamina-moduko Mgm1 proteinan, CLrekiko interakzioa txortenen puntan kokatutako lisina modulu baten bidez ematen da. DRP1en, 557, 560, 569 eta 571 (3 isoforman) kokatutako lisinak alaninara aldatzean DRP1ek CLrekin batzeko duen gaitasuna kaltetuta geratzen da. Lisina hauek ustez desegituratutako gune batean kokatzen dira, zeina CL batzeko beharrezkoa den flexibilitatea eskeini dakioken. Interresgarriki, giza dinamina-moduko MxA proteinan desegituratutako begiztan kokatutako lisinen modulu bat lipido-batuketarako modulu bezala funtzionatzen du (von der Malsburg *et al.*, 2011). Gure emaitzek frogatzen dute B intsertoan dauden zenbait lisina DRP1ek lipidoekin batuketa egokia izateko beharrezkoak direla.

Azkenik, mitokondrioko lipido espezifikoa den CLak DRP1en funtzioa erregulatzeko dituen bi mekanismo desberdin identifikatu ditugu. Lehenengoa, DRP1 CLrekin zuzenki interakzionatzen

du, proteina oligomeroetan antolatzea baimentzen duena, eta bigarrena, CLrekin interakzioak DRP1en GTPasa aktibitatea areagotzen du. Eskuizkribuaren errebisioa ematen zen bitartean, McDonald *eta lank.* (2014) (Macdonald *et al.*, 2014) antzeko aurkikuntzak erakutsi zituzten. GTPasa aktibitatea lipidoari batutako formaren ezaugarri tipikoa den pisu molekular handiko oligomeroen eraketaren menpekoa dela proposatzen dugu, nahiz eta hau zuzenean erakusteko beharra dagoen. Interesgarria da, dinaminek PIP<sub>2</sub>-ri batzerakoan handitzen den GTPasa aktibitate basal nahiko handia dutela. Gainera, aurreko emaitzekin alderatuz (Salim *et al.*, 1996), PH domeinuan emandako mutazioek GTPasa aktibitatea aldatu dezaketela proposatu da (Kenniston & Lemmon, 2010). Mitokondriaren morfologia eraldatzen duten proteinentzat ere antzeko mekanismo molekularra deskribatu da. Dinaminekin erlazionatutako OPA1 GTPasak GTP hidrolisi basal baxua du, fosfolipido anionikoak dituzten mintzen asoziazioarekin handitzen dena. Dinaminentzat deskribatu den bezala, lipido asoziazioak proteinaren oligomerizazioa eta GTP hidrolisiaren handipena dakar. Kasu honetan ere, lipido-batuketa kaltetzen duten mutazioek CL-ren GTP hidrolisiaren areagotzearen murrizpena dakarte, atrofia optiko dominantea eragiten duen Q785R mutazioa kasu (Ban *et al.*, 2010). Legamien ortologoa den Mgm1en kasuan, kontserbatutako zenbait lisina beharrezkoak dira proteinaren batuketa eta GTPasa aktibitatearen areagotzea gertatzeko (Rujiviphat *et al.*, 2009). Gure datuek DRP1en lipido asoziazioaren beharra zehazten dute eta bere aktibazio funtzionala dinamina superfamiliako beste kideentzat deskribatutako mekanismo molekular antzekoa jarraitu dezakeela iradokitzen dute.

Laburbilduz, B intsertoan kokatzen den lau lisinez osatutako modulua aurkitu dugu DRP1 eta CL arteko interakziorako ezinbestekoa dena. Garrantzitsua da aipatzea, lisina hauek SUMOilatu daitezkeela, nahiz eta SUMOilazioak DRP1en funtzioan duen eragina zein den ez den oraindik argitu. Apoptosian zehar DRP1en SUMOilazioa BAXek eragin dezakeela proposatu da, proteina mitokondriara modu egonkorrean asoziatzea ahalbidetuko lukeena (Wasiak *et al.*, 2007). Bestalde, itzulpen osteko aldaketa hau DRP1en oligomeroen desantolaketa eta ziurraski DRP1 inaktibatze modua izan daitekeela proposatu da. Mekanismo hau, *S. cerevisiae*-ko septinentzat proposatutakoaren antzekoa delarik (Figuroa-Romero *et al.*, 2009; Johnson & Blobel, 1999). Koherenteki, SUMO -2/-3-proteasa espezifikoa den SENP3 proteinak DRP1en SUMOilazioan bitartekari dela aurkitu da, proteinaren mitokondrioko kokapena erraztuz eta fragmentazioa areagotuz (Guo *et al.*, 2013). Azken emaitzekin bat eginez, SENP3 bidezko deSUMOilazioa DRP1 mitokondriara bideratuko luke. Bertan, DRP1 MFF, MiD49 edo MiD51 bidez mitokondriara batuta geratuko litzateke. Behin mintzarekin kontaktuan, CLak bere oligomerizazioa eta GTPasa aktibitatearen handipen bat eragingo luke. Hipotesi moduan, mekanismo hau CLren MOMerako esposaketarekin erlazionatutako prozesu fisiologikoetan garrantzitsua izan litekeela proposatzen dugu, apoptosian edo mitofagian kasu (Chu *et al.*, 2013;

Liu *et al.*, 2008). Amaitzeko, lan honek CL erregulazaile garrantzitsu bezala nabarmentzen du DRP1en aktibitatean eta ondorioz fisio mitokondrialean.

## 3.2 RECOMBINANT BOK EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

### 3.2.1 INTRODUCTION

A critical step in apoptosis is the mitochondrial outer membrane (MOM) permeabilization (MOMP) allowing for the intracytoplasmic release of several mitochondrial apoptogenic factors, which are critical for activating downstream executioner caspases (Tait & Green, 2010). In vertebrates, MOMP is primarily regulated by proteins belonging to the BCL2 family, which establish a complex interaction network within themselves and with other cellular factors that ultimately dictates cell fate (Chipuk, Moldoveanu, 2010).

According to currently popular models, prosurvival BCL2-type proteins (including BCL2 itself, BCLXL and MCL1) primarily inhibit MOMP through direct interaction with and functional inactivation of proapoptotic BCL2 family members. Proapoptotic BCL2 family members, in turn, are conveniently divided into (i) BAX-type proteins (BAX, BAK and BOK) thought to act as direct effectors of MOMP once they become functionally active, and (ii) BH3-only proteins (BIM, BID, BAD, BIK, BMF, HRK, PUMA and NOXA), which seemingly trigger the functional activation of BAX/BAK/BOK effectors during early stages of the apoptotic pathway (Shamas-Din *et al.*, 2011). Despite the utility of the above-described classification of BCL2 family proteins, important questions remain unanswered. For example, concerning BAX-type proapoptotic proteins, it is unclear whether BOK shares with BAX/BAK the same molecular mechanisms of activation and action.

Deciphering the precise manner by which a particular BCL2 family member acts within the native cellular environment is very difficult, mainly due to the ever-increasing number of BCL2 family members and the potential combinatorial interactions among them and among other cellular factors. In this context, during the last decades, the increased availability of a variety of recombinant BCL2 family proteins has been tremendously useful for obtaining high-resolution structural information of individual BCL2 family members, as well as for developing simplified *in vitro* reconstituted systems that allowed gaining crucial insights into the mechanisms of action of several BCL2 family proteins (Basañez & Hardwick, 2008; Petros *et al.*, 2004). However, in order to perform structural/mechanistic studies of this kind with a particular BCL2 family member, first it is necessary to produce sufficient amounts of the protein of interest in a recombinant, purified, and homogeneous form.

Recombinant proteins are used throughout biological and biomedical science. Their production was once the domain of experts, but the development of simple, commercially-available

systems has made the technology more widespread. The use of tagged fusion proteins is probably one of the most important advances made in this research field during the last decades. Fusion proteins are simple and convenient tools to work with, and for many applications a single purification step using affinity chromatography is generally sufficient. However, the use of fusion proteins as tools for purifying membrane-interacting proteins is still a challenging process (Gräslund *et al.*, 2008; Smith, 2011). Of note, detergents are frequently used in purification schemes pertaining membrane-interacting proteins. However, it is highly recommended to avoid the use of detergents when dealing with BCL2 family proteins, because these chemicals have been shown to trigger non-physiological conformational changes in a variety of BCL2 family members.

Current structural and mechanistic information for BOK is much more limited than for BAX and for BAK. This is partly due to the lack of established procedures that allow obtaining BOK in a recombinant form amenable for biophysical and mechanistic studies, which is unlike the case of BAX/BAK. Here, we describe studies aimed to produce human BOK in a recombinant, purified, and detergent-free form. Our initial attempts for obtaining a full-length (FL) version of BOK fulfilling these criteria failed. However, we succeeded obtaining a construct of BOK lacking its C-terminal hydrophobic region, in a soluble and homogeneous form and without using any detergent. We also report the characterization of such recombinant purified BOK protein using different biophysical and biochemical methods.

### 3.2.2 MATERIALS AND METHODS

**Materials-** KCl, NaCl, Tris Base, EDTA, lisozyme, TCEP, MES, Polyethylen glycol (PEG), Zinc acetate, DNase and ampicillin (Amp) were purchased from Sigma-Aldrich. Glycerol was purchased from VWR. Protease inhibitors were purchased from Roche. LB and TB were purchased from Teknovas. GST beads were purchased from Abtbeads. PreScission protease was purchased from GE Healthcare. JBS Solubility Kit A:Buffer Kit, JBS Solubility Kit B:Additive Kit, JBS Classic I HTSL Kit and JBS Classic II HTSL kit from Jena Biosciences. Additive Screen HT was purchased from Hampton Research. Sypro Orange from Molecular Probes. NextalDWBlock was purchased from Qiagen.

**DNA constructs and cloning-** The cDNA of human BOK full-length (FL) was obtained from Origene and subcloned into a pGEX vector to express the protein in bacteria as a GST-tagged fusion protein. GST-BOKFL-6His was subjected to codon optimization by Genscript. This sequence was amplified using the pair of primers: Fwd 5'-TAA GGA TCC ATG GAA GTT CTG CGT CGC AGT TC-3' and Rev 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT AGT GAT GGT GAT G-3'. The resulting PCR product, corresponding to a sequence encoding GST-BOKFLop-6His, was ligated into *Bam*HI/*Not*I

sites of pGEX vector. In addition, the same optimized sequence was also amplified using the pair of primers: Fwd 5'-TAA GGA TCC ATG GAA GTT CTG CGT CGC AGT TC-3' and Rev 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT AGC GTT CCG GCA GCA GCA CAA A-3'. The resulting PCR product, corresponding to a sequence encoding GST-BOKFlop, was ligated into *Bam*HI/*Not*I sites of pGEX vector.

Recombinant human BOK lacking 24 amino acids at its C-terminus and with a 6-Histidine tag (BOK $\Delta$ C-6His) was synthesized by DNA 2.0 with the DNA being subjected to codon optimization for expression in *E. coli* (Menlo Park, CA, U.S.A). This sequence was PCR amplified using the following pair of primers: Bok op Fwd 5'-TAA GGA TCC ATG GAG CGC CCC GGA CGT G-3' and Rev 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT AGC GTT CCG GCA GCA CAA A-3'. Using this plasmid as template different constructs were obtained by cloning: 6His-BOK $\Delta$ C-6His was obtained by amplifying the sequence with the following primers: Fwd 5'-GTA AAT ACG CGT ATG GAG GTG CTG CGG CGC-3' and Rev 5'-GTA AAT GTC GAC TCA TCT CTC TGG CAG CAG CAC-3'; and GST-BOK $\Delta$ C-6His, 5'-TAA GGA TCC ATG GAA GTT CTG CGT CGC AGT TC-3' and Rev 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTC ATC TCT CTG GCA GCA GCA C-3'. This last vector contains a GST sequence followed by a preScission protease cleavage site (LEVLFG/GP).

**Expression and purification-** Details for the protocols are given in the main text of this Chapter.

**Analytical size-exclusion chromatography (SEC)-** A sample was loaded onto a superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) previously equilibrated with 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA and 1mM TCEP running at a flow rate of 1 ml/min at 4°C. The column was calibrated with gel-filtration standard proteins from Pharmacia (Michigan, U.S.A).

**Mass spectrometry-** The molecular mass of a freshly-purified sample of BOK $\Delta$ C-6His was analyzed in the Proteomics Unit of the UPV/EHU.

**Far-UV circular dichroism (CD) measurements-** Far-UV CD spectra were recorded at 37°C on a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Spectroscopic Co. Ltd., Hachioji City, Japan) equipped with a JASCO PTC-423S temperature control unit, using 1-mm pathlength cell. Data were collected every 0.2 nm at 50 nm/min from 260 nm to 195 nm, with a band-width of 2 nm, and results were averaged from 20 scans. BOK $\Delta$ C-6His protein was diluted in CD buffer (100 mM KCl, 10 mM Tris (pH 7.5)) and allowed to equilibrate for 10 min prior to CD analysis. Each spectrum represents the average of three distinct spectral recordings. The contribution of buffer to the measured ellipticity was subtracted as blank. Molar ellipticity values were calculated using the expression  $[\theta] = \theta / 10 \cdot l \cdot n^2 \cdot c$ ; where:  $\theta$  is ellipticity (millidegrees),  $c$  is the protein concentration (mol/liter),  $l$  is the cuvette path length in cm and  $n$  is the number of peptide bonds in the protein. The amount of secondary structural elements was estimated with CD-Pro software (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).

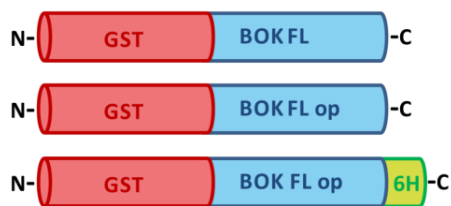
**Protein stability measurements:Thermofluor assay-** Samples containing 0.7  $\mu$ l 500X Sypro Orange (Molecular Probes), 37  $\mu$ l of test compound (buffer or additive), and 4.5  $\mu$ l of 1.5 mg/ml protein were added to the wells of a 96-well thin-wall PCR plate (Bio- Rad). Water was added instead of test compound in control samples. The plates were sealed with Optical-Quality Sealing Tape (Bio-Rad) and heated in an iCycleriQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) from 20°C to 95°C heating 0.5°C/min. Fluorescence changes in the wells of the plate were monitored simultaneously with a charge-coupled device (CCD) camera. The wavelengths for excitation and emission were 300 nm and 470 nm, respectively.

**Protein crystallization-** This work was done in collaboration with Dr. Kornelius Zeth and Dr. Enea Sancho. Purified BOK $\Delta$ C-6His was concentrated to 2 mg/mL in the buffer providing highest stability: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 10% glycerol, pH 7.5. Crystals were obtained using sitting drop vapor diffusion at 21°C. 800 nl protein and 200 nl reservoir solutions (JBScreen Classic I HTSL, JBScreen Classic II HTSL and NextalDWBBlock Classic Suite) were mixed and crystals were obtained after 21 days from condition G1 of the JBScreen Classic I HTSLscreen, containing 10% w/v PEG 8000, 100 mM MES Sodium Salt pH 6.5 and 200 mM Zinc Acetate. Hanging-drop method was used to amplify the crystals. 1  $\mu$ l of protein and 1  $\mu$ l of buffer (0.1 M MES pH 6.5, 10% PEG 800, 0.2 M Zinc Acetate) were dropped in a 500  $\mu$ l buffer reservoir-containing chamber, and additives from Additive Screen HT (Hampton Research) were also used. They were harvested directly from their crystallization drops and data were collected at ALBA synchrotron in Barcelona.

## 3.2.3 RESULTS

### 3.2.3.1 Expression of BOK FL

We obtained human BOKFL cDNA from Origene. First, this cDNA was subcloned into a pGEX vector designed for expressing GST-tagged fusion proteins in *E. coli*, thereby producing the construct termed “GST-BOKFL” (Figure 1). The GST-BOKFL construct was subsequently subjected to codon optimization generating the “GST-BOKFLop” construct. As a third approach, a 6 Histidine tag was added to the C-terminus of “GST-BOKFLop” producing the “GST-BOKFLop-6His” construct.



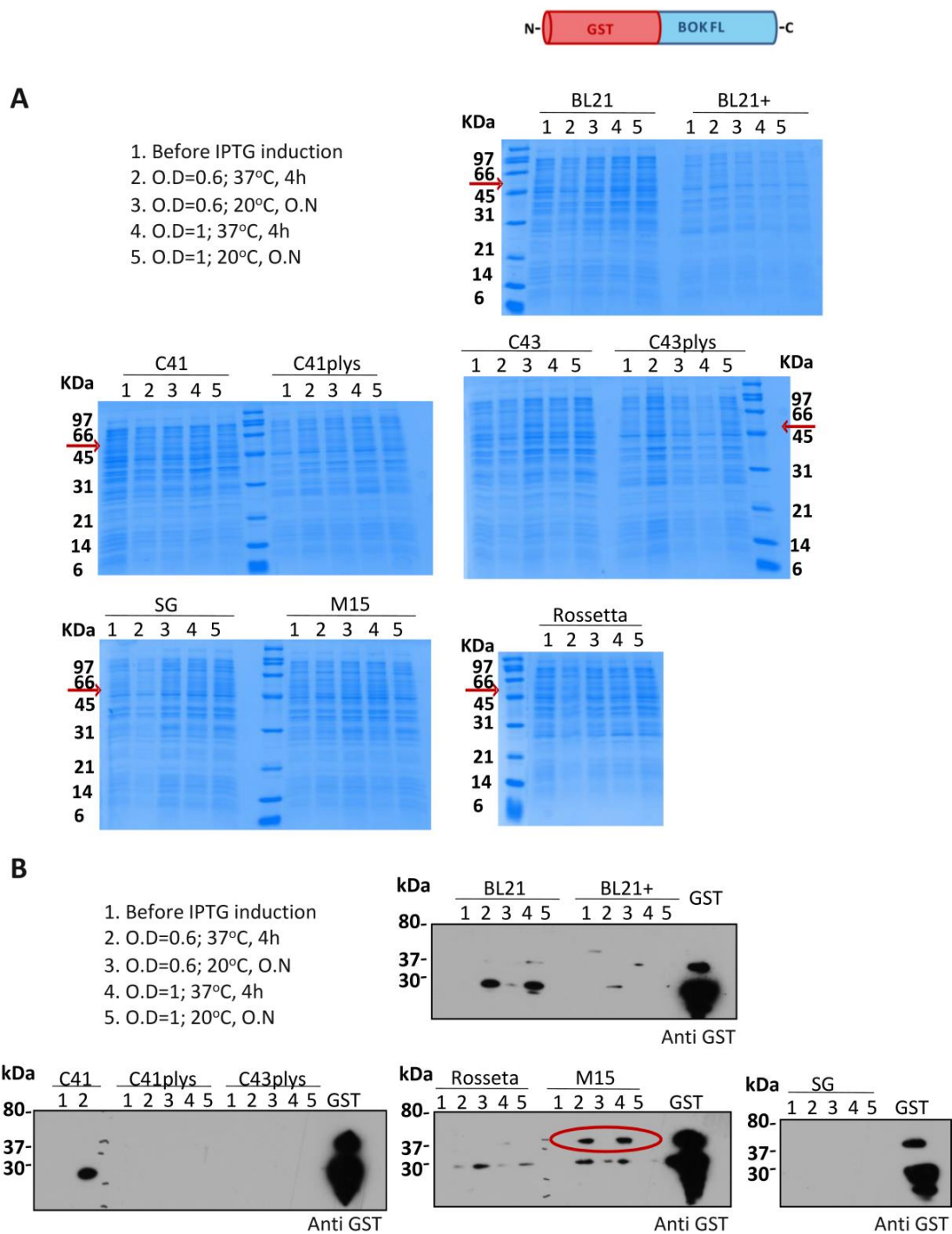
**Figure 1. Schematic representation of different constructs generated to attempt expressing recombinant human BOK in a full-length form (BOK FL).** GST: Glutathione S transferase; 6H: 6Histidines, op: codon-optimized for expression in *E. coli*.

We analyzed expression of GST-BOKFL construct in 9 different *E. Coli* strains (BL21, BL21 codon +, C41, C41pLys, C43, C43pLys, SG, M15, and Rosetta). In addition, we examined the effect of (i) triggering IPTG induction at two different ODs (0.6 and 1), and (ii) incubating bacteria at 37°C for 4 hours or at 20°C overnight. However, despite all these attempts, the appearance of an IPTG-dependent band at the mw expected for GST-BOKFL was not detected by coomassie blue staining under any condition tested (Figure 2A).

To analyze whether GST-BOKFL was expressed at levels too low to be detected by coomassie blue staining, we performed immunoblotting experiments using an anti-GST antibody. However, clear GST-BOKFL expression was not observed under any condition examined (Figure 2B). Of note, a faint band coinciding with the expected mw of GST-BOKFL was detected in M15 strain after IPTG addition (red circle in Figure 2B). However, a similar band also appeared in the “GST” sample used as a negative control, and thus the precise origin of such GST-immunoreactive band remains unclear. One possibility is that this band reflects a fraction of dimeric GST that resisted monomerization under our assay conditions.

We also followed the same protocol to attempt expressing the GST-BOKFlop and the GST-BOKFlop-6His constructs. Unfortunately, expression of the two constructs was undetectable under all condition examined (data not shown).

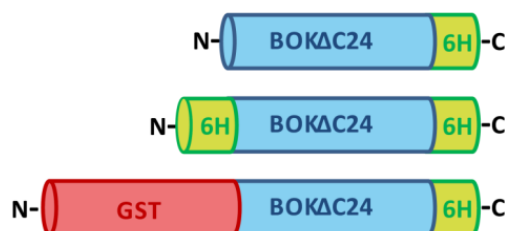




**Figure 2. Tests to assess BOKFL expression. A)** Failure to detect GST-BOKFL expression by coomassie blue staining, using indicated conditions and *E. Coli* strains. Red arrows marks the mw estimated for GST-BOKFL. **B)** Failure to detect GST-BOKFL expression by immunoblotting. Red ovals mark bands detected by immunoblotting consistent with mw predicted for GST-BOK and GST dimer.

### 3.2.3.2 Expression of BOK $\Delta$ C

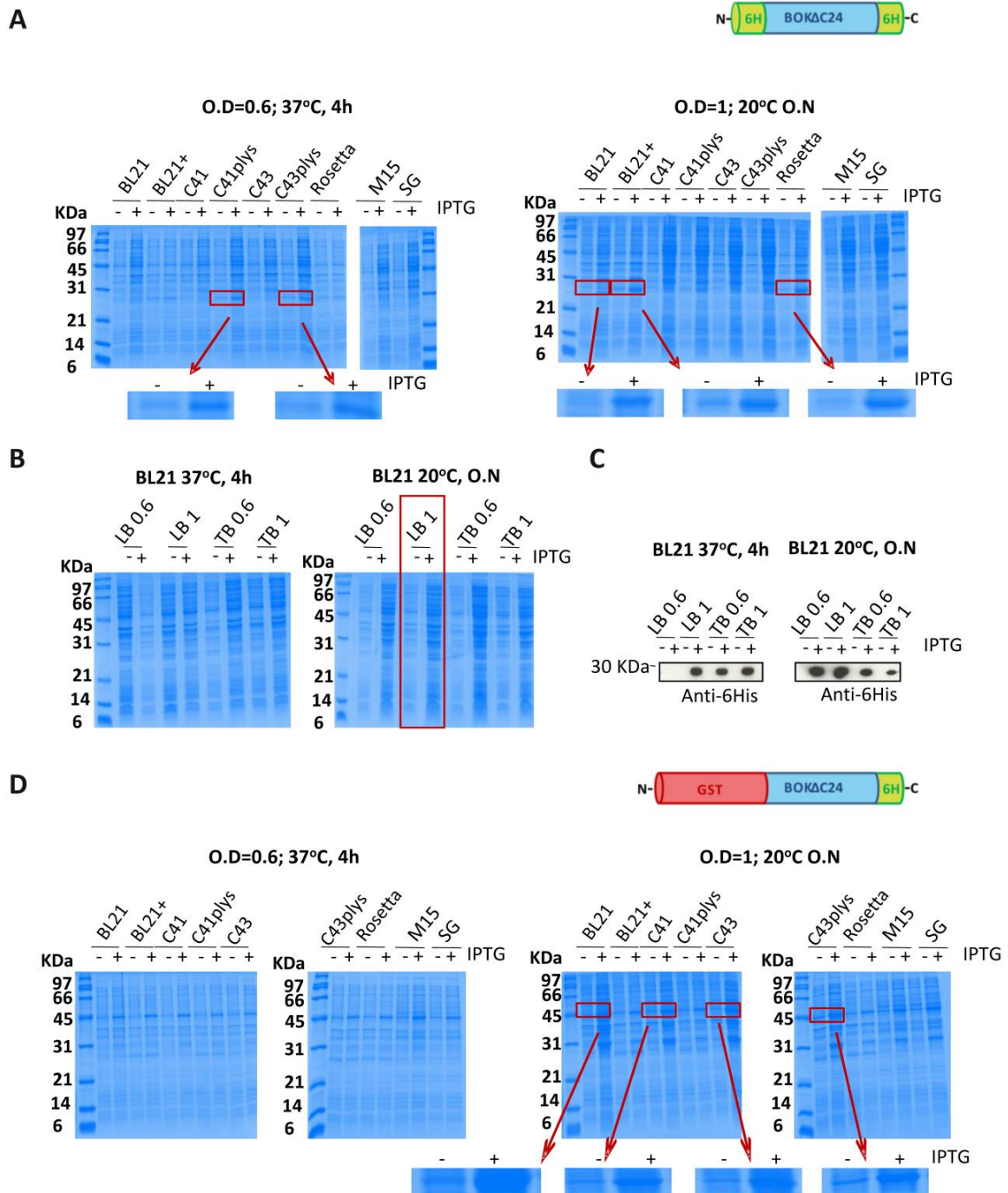
Next, we designed a construct of BOK having its C-terminal 24 residues deleted, and containing a 6-Histidine tag at the C-terminus of the protein (BOK $\Delta$ C24-6His). In addition, BOK $\Delta$ C24-6His construct was subcloned into two different vectors to generate the 6His-BOK $\Delta$ C24-6His construct and the GST-BOK $\Delta$ C24-6His construct (Figure 3).



**Figure 3. Schematic representation of different constructs used for expressing recombinant human BOK lacking its putative TM domain (BOK $\Delta$ C).**

To analyze expression levels of the different BOK $\Delta$ C constructs, we followed the same protocol described in Figure 2. We were not able to detect expression of the BOK $\Delta$ C-6His construct under any condition tested. However, the 6His-BOK $\Delta$ C-6His and the GST-BOK $\Delta$ C-6His constructs proved to be amenable for expressing the BOK variants (Figure 4). On the one hand, coomassie-blue staining detected a prominent band corresponding to the mw expected for 6His-BOK $\Delta$ C-6His under the following conditions: (i) C41 plys and C43 plys bacterial strains induced with IPTG at OD=0.6, followed by bacterial growth for 4 hours at 37°C; and (ii) BL21, BL21-codon plus and Rossetta strains induced with IPTG at OD=1, followed by bacterial growth over night at 20°C (Figure 4A). We also assessed whether using Terrific Broth (TB) as a culture medium instead of the “normal” LB medium could increase the level of expression of 6His-BOK $\Delta$ C-6His (Fig. 4B). However, the levels of 6His-BOK $\Delta$ C-6His expression were similar in TB and LB media. Subsequent immunoblot analysis of these samples confirmed the identity of the 6His-BOK $\Delta$ C-6His protein, and also served to identify optimal conditions required to express this specific construct (Figure 4C).

On the other hand, regarding the GST-BOK $\Delta$ C-6His construct, detectable expression was also observed by coomassie-blue staining under a variety of conditions, the most prominent of which was using the BL21 *E.coli* strain, adding IPTG at OD=1, and subsequently growing bacteria overnight at 20°C (Figure 4D).

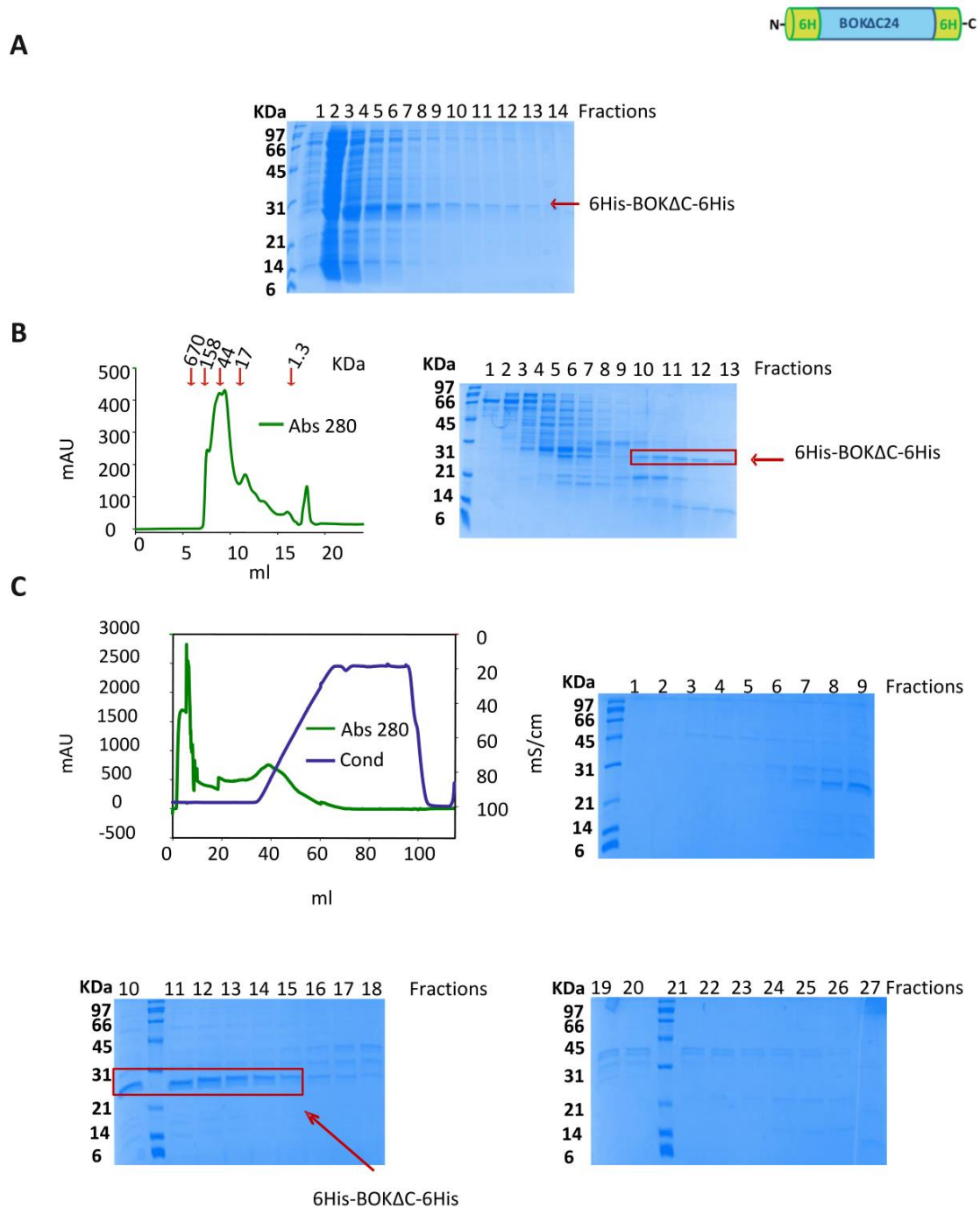


**Figure 4. Tests to assess BOKΔC expression. A)** Tests for expression of 6His-BOKΔC-6His were performed as explained in Figure 2. Bands with mw expected for 6His-BOKΔC-6His protein that underwent an IPTG-dependent increase in intensity appear enclosed within red rectangles, and also magnified below the gels. **B)** Comparison of 6His-BOKΔC-6His expression levels using LB or TB media. The condition displaying the most prominent, IPTG-dependent level of 6His-BOKΔC-6His expression is highlighted in red. **C)** Immunoblot analysis of 6HisBOKΔC-6His expression under the same conditions explained in B. **D)** Tests for expression of GST-BOKΔC-6His. Other conditions as explained in Panel A.

### 3.2.3.3 BOK $\Delta$ C purification

First, we tried to purify the 6His-BOK $\Delta$ C-6His construct. What follows is a detailed description of the purification protocol. A single colony of the transfected *E.coli* bacteria was inoculated into 500 ml bacterial growth medium containing the appropriate antibiotic, and the mixture was incubated at 37°C over night. Next, 200 ml of this medium were transferred into a flask containing 2 l of LB medium, and the bacteria were grown at 37°C until the OD reached 0.6. Then, 1 mM IPTG was added to induce protein expression, bacteria were grown overnight at 20°C, the cells were harvested by centrifugation, and pelleted bacteria were resuspended in lysis Buffer (500 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM imidazole, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH=8, 1mg/ml lysozyme, DNase, protease inhibitors, 10% glycerol). This mixture was further incubated at 4°C for 2 hours, and then samples were subjected to sonication using a 4X 10on/10off/10sec cycle on ice. After cell disruption, the resultant suspension was centrifuged (20,000x g, 20 min), the pellet was discarded, and the supernatant was kept on ice for subsequent purification steps. Specifically, the sample was subjected to Niquel immunoaffinity chromatography using Ni-NTA “Superflow” beads. Ni-NTA beads were washed with buffer A (500 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM imidazole, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, pH=8), collected by centrifugation, incubated with the bacterial supernatant for 2h, and packed in a column connected to a peristaltic pump. Finally, the column was washed with buffer A, proteins were eluted with buffer A containing 500 mM imidazole instead of 5 mM imidazole, and 14 fractions of 0.5ml were collected for SDS-PAGE analysis and Coomassie-blue staining. As shown in Figure 5A, eluted fractions contained a prominent band showing the mw expected for 6His-BOK $\Delta$ C-His.

Next, the fractions enriched in the presumptive 6His-BOK $\Delta$ C-His protein were concentrated using YM-10 Microcons, and they were loaded into a Superdex<sup>TM</sup> 75 HR 10/30 size exclusion column equilibrated with Buffer B (500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris , pH 8, 10% glycerol). The sample was eluted with a flow-rate of 0.5 ml/min, while its protein content was continuously monitored by 280 nm absorbance (Figure 5B, Left). However, when peak protein fractions were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie-blue staining, protein bands other than the one presumptively corresponding to 6His-BOK $\Delta$ C-6His protein became evident (Lanes 10, 11, and 12 in Figure 5B, Right). To attempt purifying the 6His-BOK $\Delta$ C-6His protein further, we used ion-exchange chromatography with a CAPTO-S column. Protein-containing fractions were first dialyzed overnight against Buffer D (50 mM Hepes, pH 8), and dialyzed samples were then injected into the CAPTO-S column pre-equilibrated in Buffer D. Next, a linear salt-gradient was applied while protein elution was continuously monitored by measuring 280 nm absorbance (Figure 5C, Left). Unfortunately, eluted fractions containing the presumptive 6His-BOK $\Delta$ C-6His protein still appeared contaminated with other protein bands (Lanes 10-14, Figure 5C).

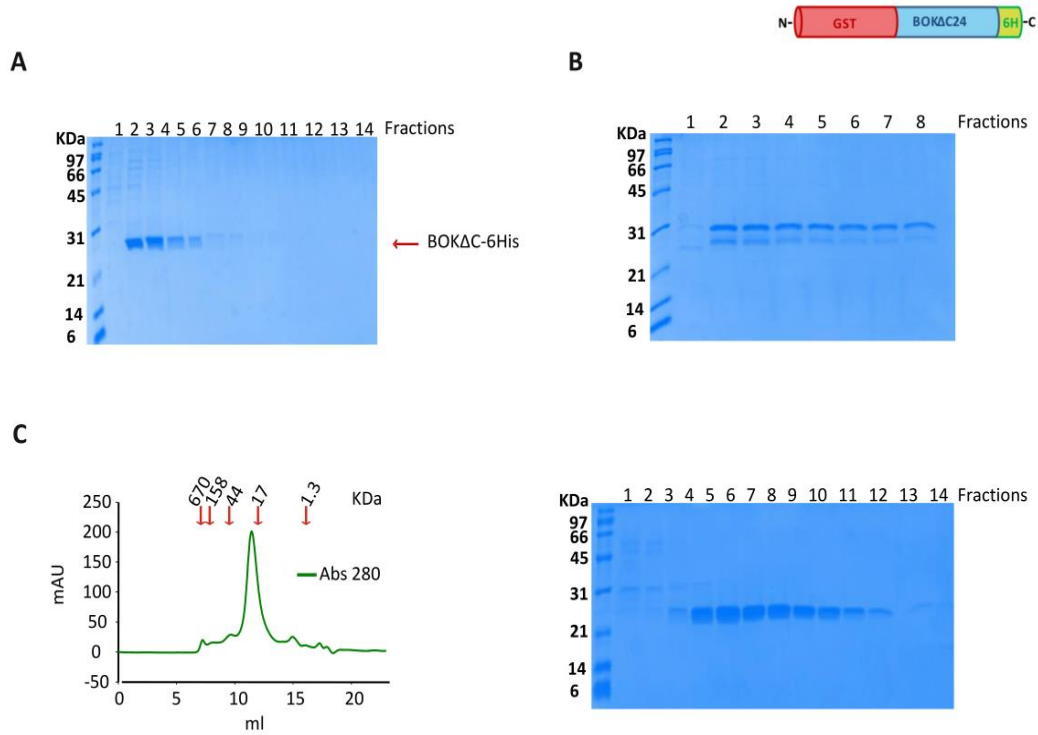


**Figure 5. Purification of human 6His-BOKΔC-6His.** **A)** SDS-PAGE analysis of fractions eluted from Ni-NTA beads. **B)** Left: Elution profile after size-exclusion chromatography on Superdex 75 HR 10/30 column. Right: corresponding peaks were collected and analyzed by SDS-PAGE. The band presumptively corresponding to 6His-BOKΔC-6His is shown within a red rectangle. **C)** Left: Elution profile after ion-exchange chromatography on CAPTO-S column. Right and Bottom: Corresponding peaks were collected and analyzed by SDS-PAGE. The band presumptively corresponding to 6His-BOKΔC-6His protein is shown within a red rectangle.

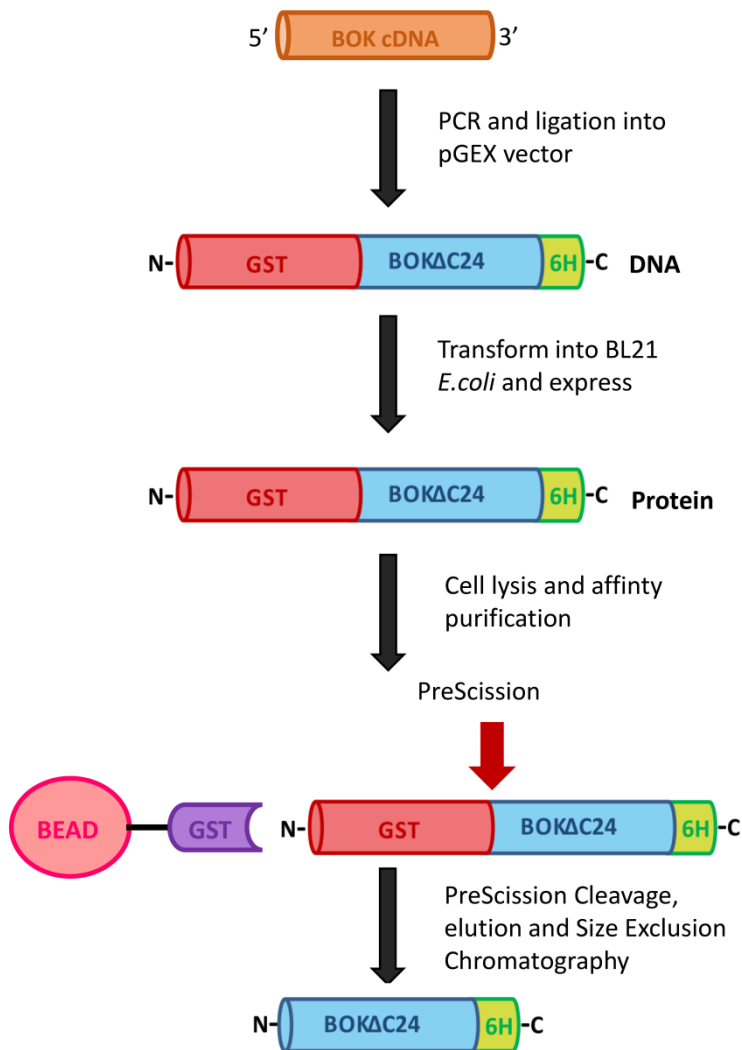
Next, we attempted to purify GST-BOK $\Delta$ C-6His. The first steps of the purification protocol were the same as described for BOK $\Delta$ C-6His: (i) inoculating a single colony of the transfected *E.coli* bacteria in 500 ml medium, (ii) growing bacteria at 37°C over night, (iii) transferring 200 ml of the inoculum into a 2 l flask, (iv) growing bacteria at 37°C until the OD reached 1, (v) adding 1 mM IPTG to induce the protein expression, (vi) growing bacteria overnight at 20°C, (vii) harvesting bacteria by centrifugation at 3500x g for 30 min, and (viii) resuspending the bacterial pellet in lysis Buffer, followed by a 2-hour incubation.

Importantly, in this case a French Press was used to rupture bacteria (3 cycles at 16,000 psi), because sonication did not yield a clear suspension. After cell disruption, the resultant suspension was centrifuged at 30,000x g for 30 min, the pellet was discarded and the supernatant was kept on ice for subsequent purification steps. At this time, the protein was purified by affinity chromatography using 1 ml of washed “Glutathione beads” for each liter of bacterial culture. Beads were then washed three times with buffer C (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA and 1 mM TCEP) followed by centrifugation for 5 min at 500x g. The bacterial supernatant was then mixed with the glutathione beads, and the mixture was subsequently incubated for 2h in an orbital-rotator at 4°C. Then, the beads with bound proteins were packed in a column connected to a peristaltic pump, the column was washed with 10 bed volumes of buffer A, and the beads were incubated with preScission protease overnight at 4°C to cleave-off the GST from the GST-BOK $\Delta$ C-6His fusion protein. Next, the protein was eluted using buffer A supplemented with 10% glycerol, and fractions of 1 ml were collected for SDS-PAGE analysis and Coomassie-blue staining. Several eluted fractions contained a prominent band with the mw expected for the BOK $\Delta$ C-6His protein which had an apparent purity of >80% (Lanes 2-6, Figure 6A). To confirm efficient GST cleavage, the beads were further incubated with 20 mM Glutathione for 30 min, and eluted fractions of 1 ml were collected for SDS-Page analysis and Coomassie-blue staining. To increase the degree of purity of the protein, the sample was loaded onto a superdex 75 HR 10/30 column. On this column, the band presumptively corresponding to BOK $\Delta$ C-6His eluted as a single peak with an apparent molecular mass of  $\approx$ 25kDa, consistent with the mw expected for monomeric BOK $\Delta$ C-6His (Figure 6C, Left). Peak protein fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie-blue staining (Figure 6C, Right). As can be seen, several eluted fractions contained the band presumptively corresponding to BOK $\Delta$ C-6His with >90% purity (Lanes 4-12, Figure 6C, Right). These samples were concentrated, aliquoted, and kept at -80°C for further analysis.

The final protocol designed for obtaining the purified recombinant BOK $\Delta$ C-6His protein is schematically illustrated in Figure 7.



**Figure 6. Purification of human GST-BOKΔC-6His.** **A)** SDS-PAGE analysis of fractions obtained after cleavage with preScission protease. **B)** SDS-PAGE analysis of fractions obtained after elution with Glutathione. **C)** Elution profile obtained after chromatography on a Superdex 75 HR 10/30 column. Corresponding peaks were collected and analyzed by SDS-PAGE.



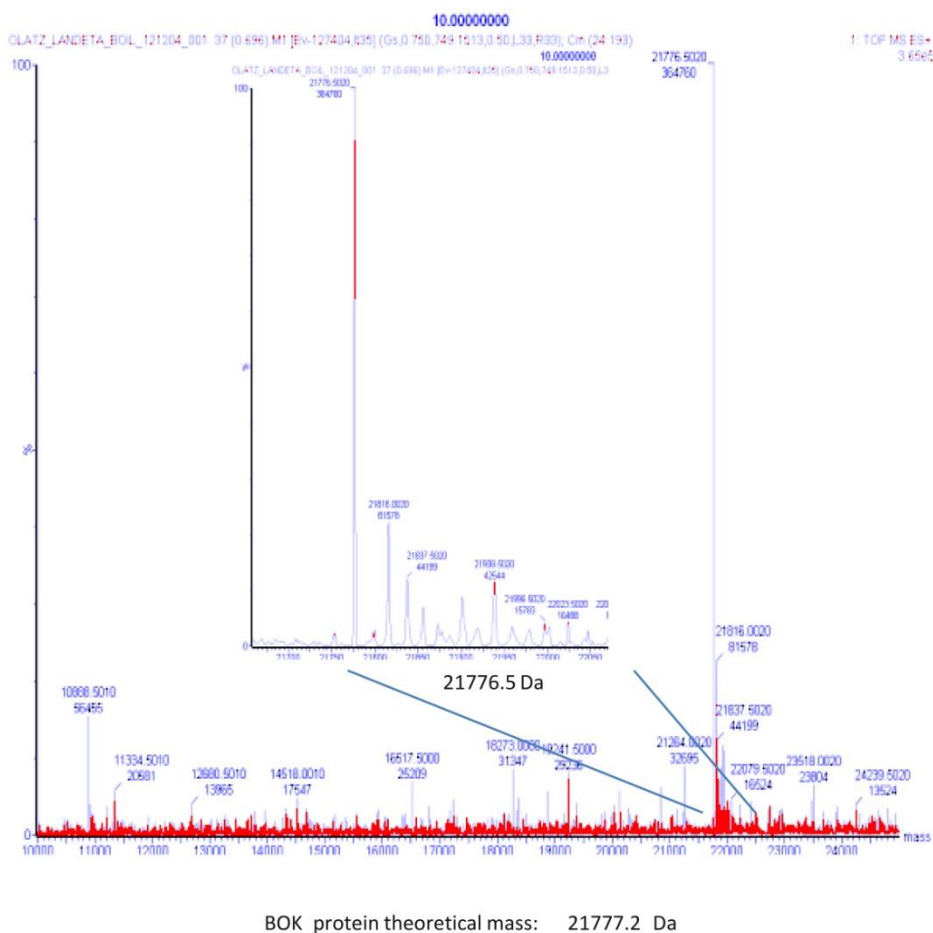
**Figure 7. Outline for the protocol used for obtaining recombinant BOKΔC-6His protein in a purified form.** **1)** Synthetical BOKΔC-6His coding sequence was PCR-amplified and ligated into pGEX vector. **2)** BL21 *E. coli* strain was transformed with this DNA construct. **3)** Cells were harvested and lysed, and protein was purified by immunoaffinity using GST beads. **4)** GST was cleaved on-column by PreScission protease, BOKΔC-6His was eluted, and it was subjected to size-exclusion chromatography.

### 3.2.3.4 BOKΔC characterization

A sample containing purified BOKΔC-6His was analyzed by mass spectrometry (MS). The theoretical mass estimated for BOKΔC-6His was 21777.2 Da. The mass obtained by MS was

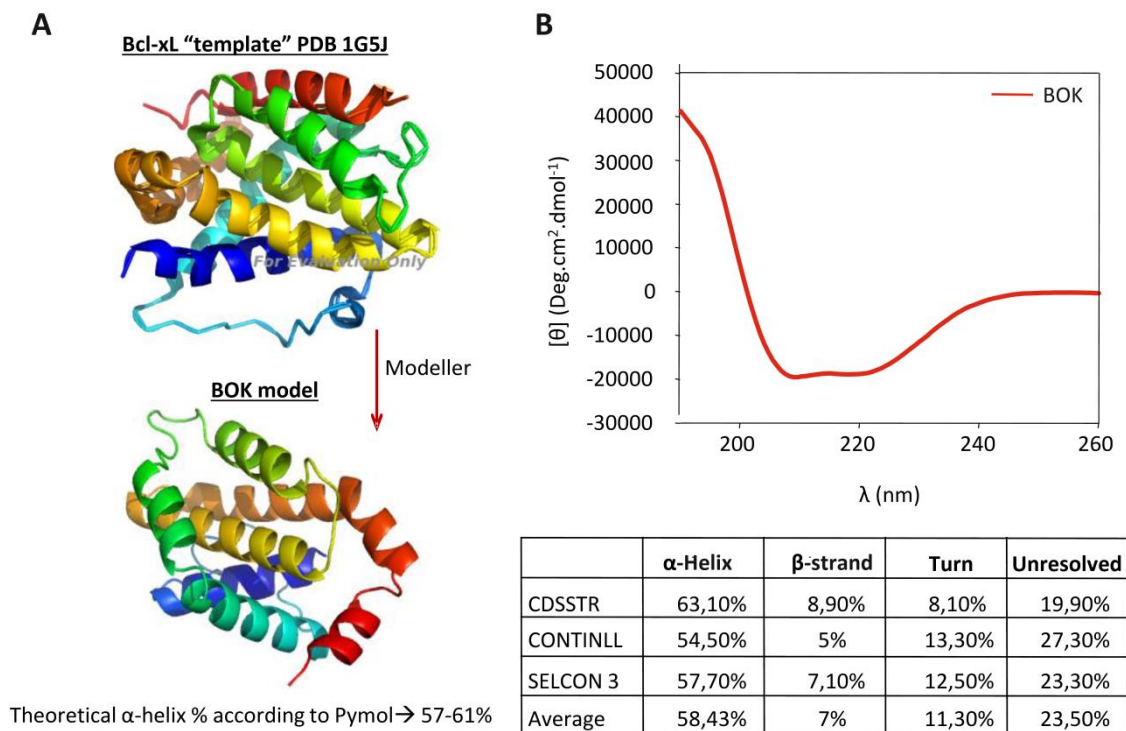


21776.5 Da (Figure 8). Thus MS confirmed that the purified protein was BOK $\Delta$ C-6His.

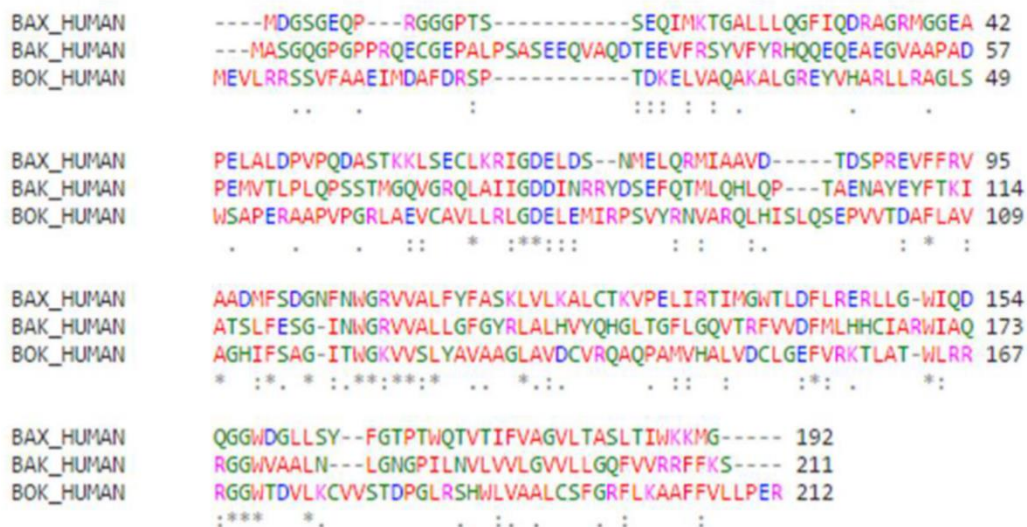


**Figure 8. Confirmation by MS of BOK $\Delta$ C-6His identity.**

Next, Circular Dichroism (CD) was used to assess the secondary structure of the purified recombinant BOK $\Delta$ C-6His protein. The CD spectra of BOK $\Delta$ C-6His displayed the characteristic features of a well-folded  $\alpha$ -helical globular protein, showing minima at 222 and 208 nm and a positive signal at 200 nm (Figure 9B). In Figure 9A, a three-dimensional (3D) structural model of BOK $\Delta$ C is shown which was built by structural-alignment of BOK $\Delta$ C with BCL-XL $\Delta$ C (PDB 1G5J). Interestingly, the % helicity of BOK $\Delta$ C according to this 3D model was close to the experimental value obtained by CD measurements. This result confirmed proper folding of our purified recombinantly-expressed BOK $\Delta$ C24-6His protein. We also performed multiple sequence alignment between BAX, BAK, and BOK using Clustal 2.1 (Figure 10). The degree of homology between BAX, BAK and BOK was variable along their amino acid sequences, with the N-terminal  $\approx$ 20-25 residues being the most divergent segments between the three proteins.

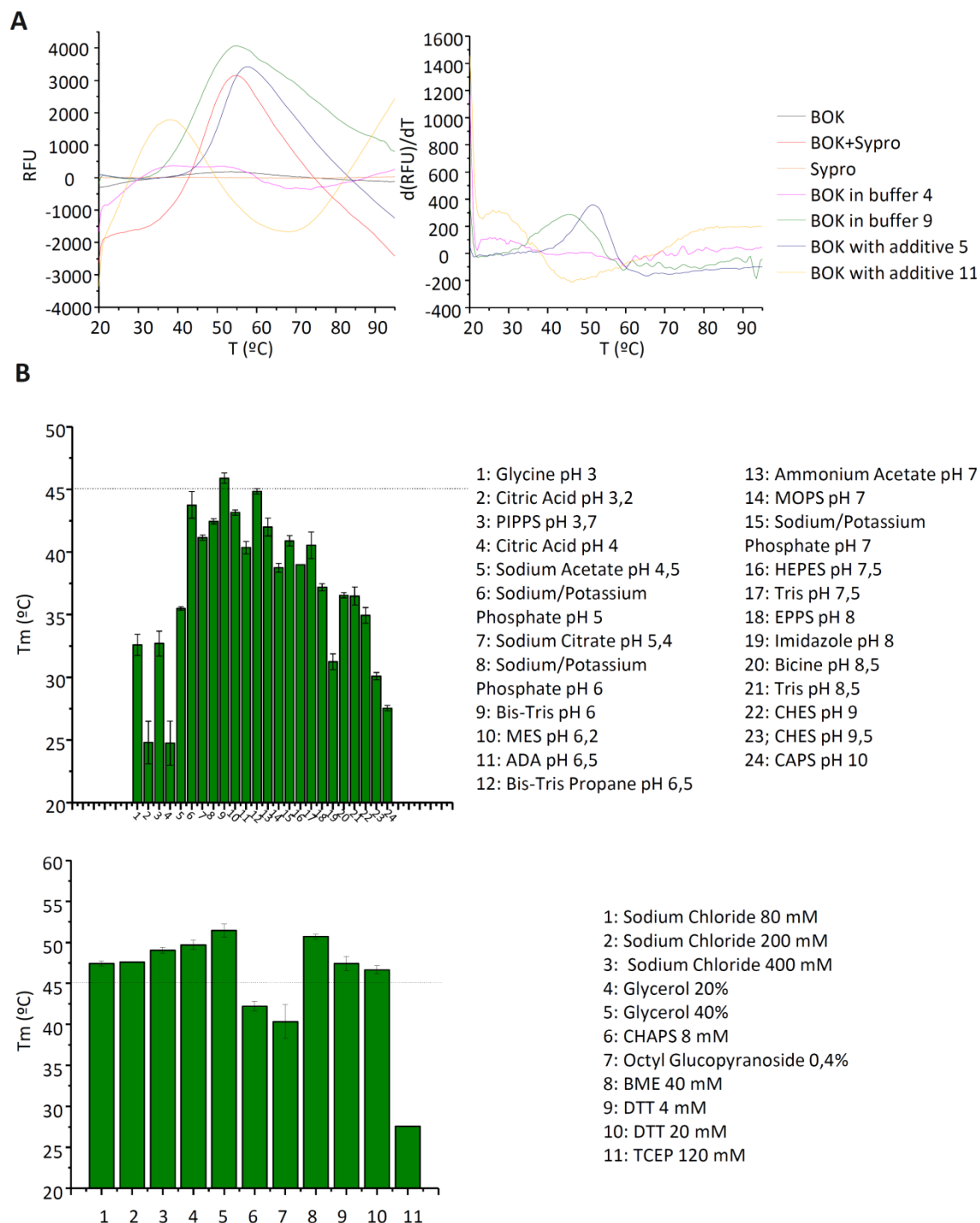


**Figure 9.3. D modeling and circular dichroism (CD) analysis of BOK $\Delta$ C-6His protein. A)** 3D model of BOK $\Delta$ C using Bcl-XL $\Delta$ C (PDB 1G5) as a template. Structures were constructed with Pymol. **B)** CD spectra of BOK $\Delta$ C-6His protein and secondary structure prediction table.



**Figure 10. Sequence alignment of human BAX, human BAK and human BOK performed using Clustal 2.1 multiple sequence alignment.**

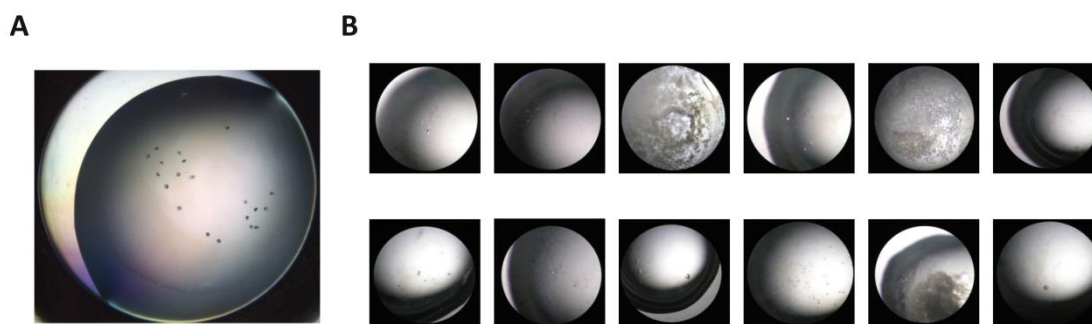
We wished to crystallize BOKΔC-6His protein for X-Ray structural analysis. To this aim, we first used the Thermofluor assay to assess the stability of this protein in different buffers, because this is an important parameter for yielding crystals (Figure 11).



**Figure 11. Thermofluor assay. A)** Left panel: Thermal curves of controls and BOKΔC-6His in presence of two different buffers and two different additives. Right panel: First derivative of thermal curves. **B)** Graphs representing the contribution of buffers and additives to the stability of BOKΔC-6His.

The Thermofluor assay was performed in a 96-well format, with all wells containing the BOK $\Delta$ C24-6His combined with the SPYRO orange fluorescent dye, while various buffers and additives were added to each well. The fluorescence intensity of SPYRO dye increases when interacting with hydrophobic protein segments that generally appear during thermal denaturation of proteins in aqueous solution. Thus, this fluorescence-based method allows monitorization of protein thermal stability in different buffered solutions. A real-time PCR machine was used to heat the sample plate gradually while the emission fluorescence intensity of SYPRO dye was measured. Using this method, the following buffer and additives were identified as optimal for preserving BOK $\Delta$ C-6His stability: Tris pH 6 buffer with 40% glycerol and 40 mM BME (Figure 11). However, high concentrations of glycerol can cause problems in the crystallization process (Sedgwick *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2011). In addition, BME is a weak reducing agent, making it necessary to supply new BME every two to three days in the crystallization experiment to maintain the effectiveness of the reducing agent. In contrast, TCEP is a much stronger reducing agent, lasting about 2 to 3 weeks in a typical crystallization experiment. Thus, we decided to use lower amounts of glycerol and TCEP instead of BME.

Considering all of the above, for crystallization attempts we used BOK $\Delta$ C-6His in the following buffer: 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, 10% glycerol, pH 7.5. A widely used manner for obtaining crystals is to use a collection of diverse conditions of buffers, precipitants and other additives, collectively termed “screens”. In our case, three different screens were used: JBScreen Classic I HTSL, JBScreen Classic II HTSL and Nextal DWBlock Classic Suite. The wells were prepared and sealed containing 800 nl protein at 2 mg/ml and 200 nl reservoir solutions using the mosquito robot. The drops in the wells were observed under an optical microscope to check whether they were uniform as well as to detect rapid precipitation of the sample material. We then incubated the plates at 21°C during 21 days, visually inspecting each well every day using Crystal Farm. As shown in Figure 12A, small crystals were only detected in G1 condition of JBScreen Classic HTS I (Precipitant: 10% w/v PEG 8000, buffer: 100 mM MES Sodium Salt pH 6.5, Additive: 200 mM Zinc Acetate).



**Figure 12. Attempts for BOK $\Delta$ C-6His crystallization. A)** Crystals obtained in G1 JBScreen Classic HTS I:

Precipitant 10% w/v PEG 8000, buffer: 100 mM MES Sodium Salt pH 6.5, Additive: 200 mM Zinc Acetate  
**B)** Crystals obtained with the hanging drop method.

We next used the hanging-drop method to try increasing crystal size. This method entails a droplet containing purified protein, buffer, and precipitant being allowed to equilibrate with a larger reservoir containing similar buffers and precipitants at higher concentrations. We used the same buffer yielding small crystals in the screening test (10% w/v PEG 8000, 100mM MES Sodium Salt pH 6.5) and added different additives to try to improve the crystallization process. Larger crystals were obtained with the following additives: 0,1M L-Proline; 30% v/v Dimethyl sulfoxide; 30% v/v 1,6-Diaminohexano; 1,0M Guanidine hydrochloride; 0,1M TCEP hydrochloride; 0,1M Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate; 40% w/v Pentaerythritol ethoxylate (3/4 EO(OH)); 30% w/v Dextran sulfate sodium salt (M<sub>r</sub> 5,000); 30% w/v Sucrose; 3,0N NDSB-195; 0,15mM CYMAL-7; 5% w/v n-dodecyl N, N-dimethyl amine-N-oxide, (LDAO, DDAO) (Figure 12B). These crystals were taken to the Alba Synchrotron in Barcelona. Unfortunately, none of the crystals examined diffracted appropriately.

### 3.2.4 DISCUSSION

Experimental approaches based on *in vivo* animal models or experiments with cell cultures do not allow to clearly dissect the molecular mechanism of action of BCL2 family proteins. To circumvent this, one can try to produce recombinant versions of BCL2 family protein of interest reflecting as closely as possible its biological counterpart. However, an important hurdle is that many BCL2 family proteins contain predominantly hydrophobic C-terminal segments which considerably complicate purification of these proteins in a FL format. An alternative is to use truncated versions of BCL2 family proteins lacking the C-terminal hydrophobic segment for biophysical and structural studies. Altogether, these approaches have been crucial for understanding how antiapoptotic and proapoptotic proteins interact with each other via protein:protein interactions (Liu *et al.*, 2003; Sattler *et al.*, 1997), and have also provided crucial mechanistic information about how BAX-type proteins breach the MOM permeability barrier (Czabotar *et al.*, 2013; Gavathiotis *et al.*, 2008; Leshchiner *et al.* 2013; Moldoveanu *et al.*, 2013).

In this work, we describe several novel findings regarding production of recombinant human BOK proteins amenable for biophysical and biochemical studies. First, despite numerous attempts we failed obtaining BOK in its native, FL format. However, this does not necessarily mean that this objective could not be achieved by using a different strategy and/or optimizing the expression protocol. Of note, production of recombinant purified BAK FL has only been achieved in the context of a modified protein containing a mutagenesis-based solubilization of its hydrophobic C-terminal region (Leshchiner *et al.*, 2013). Second, we found that a recombinant version of BOK lacking its 24 last C-terminal amino acids can be easily and

conveniently produced and purified in a soluble form using *E.coli*. Moreover, we were able of purifying this recombinant protein in the absence of any detergent. This will allow us to perform further mechanistic studies to elucidate the function of BOK, as well as provide the means for structural studies. The fact that the BOK $\Delta$ C6His we produced lacks a putative membrane-anchoring region has to be taken into account because it could not reflect perfectly the physiological activity of the protein. Nevertheless, to date highly valuable mechanistic and structural information has been gained using such C-terminally deleted versions of BCL2 family proteins. In fact, the vast majority of the high-resolution structural information available corresponds to constructs of BCL2 family proteins lacking their C-terminal hydrophobic region (Czabotar *et al.* 2014). In addition, a C-terminally deleted version of BOK was reportedly active when transfected in cells, because its enforced expression enhanced cellular sensitivity to apoptosis as much as the expression of BOK FL did (Brown *et al.*, 2004). Third, we also confirmed that purified recombinant BOK $\Delta$ C-6His is properly folded. Finally, we identified optimal buffer and additive compositions required for stabilizing BOK $\Delta$ C-6His that helped in obtaining crystals of this protein. Although we obtained BOK $\Delta$ C-6His crystals that were not diffractable, further crystallization attempts should be pursued.

In conclusion, in this study we describe the production of a recombinant purified version of BOK (BOK $\Delta$ C6His), which can be used as a novel tool for gaining mechanistic insight into this poorly understood BCL2 family member, and also opens the door for obtaining high-resolution structural information of BOK via X-Ray crystallography.

## 3.3 EVALUATING THE INTERACTION OF BOK WITH MITOCHONDRIAL LIPIDS AND WITH BH3-ONLY PROTEINS

### 3.3.1 INTRODUCTION

Apoptosis is a morphologically distinct form of programmed cell death essential for normal development and tissue homeostasis (Danial & Korsmeyer, 2004). Abnormal regulation of this pathway is linked to multiple human pathological states, including cancer, autoimmunity, infection, and degenerative diseases (Hotchkiss *et al.*, 2009). In mammals, the execution of apoptotic cell death is governed by two molecular programs, which ultimately lead to activation of specific cysteinyl aspartate proteases called caspases (Strasser *et al.*, 1995). The two molecular programs are known as the extrinsic pathway activated by death receptors, and the intrinsic or mitochondrial pathway activated by a diverse array of stress signals. The “point of no return” in the intrinsic pathway is defined by the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) allowing for release of cyt c and other apoptogenic factors into the cytoplasm (Tait & Green, 2010). This leads to activation of caspases, cleavage of key cellular substrates and finally, to cell demise. Even if caspase activation is blocked, the cell usually succumbs to bioenergetic catastrophe as a result of MOMP.

The BCL2 protein family has emerged as the master regulator of MOMP and thereby constitutes a critical control point in the intracellular apoptotic cascade (Youle & Strasser, 2008). Thus, elucidating the precise mode of BCL2 protein action is attractive both from the viewpoint of understanding how a cell commits apoptotic cell death, as well as from the viewpoint of developing novel therapeutics to fight against specific human diseases (Czabotar *et al.*, 2014). The BCL2 protein family is usually divided into three functional groups based on their composition of up to four BCL2 Homology (BH) motifs, even though a stable scheme for BCL2 protein classification based on this criterion is still not definitively proven (Aouacheria *et al.*, 2013; Hardwick & Youle, 2010). One group is represented by BAX-type proapoptotic proteins (BAX, BAK, and perhaps BOK), which contain BH1-3 motifs and, once activated, directly effect MOMP. A second subclass comprises the antiapoptotic BCL2-type proteins (BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1, A1, and BCL-B), all of which possess four BCL2 homology motifs (BH 1-4) and inhibit MOMP. Finally, members of the more distantly related BH3-only subclass (including tBID and BIM), display sequence homology only within the third BH motif, and are thought to act by triggering functional activation of BAX-type proteins.

Remarkably, despite this family of proteins has been the subject of intensive investigation during the last decades, our understanding of how BCL2 family members regulate MOMP is still far from complete. On the one hand, deciphering the precise molecular pathway and biochemical mechanisms leading to functional activation of BAX-type proteins is still an unmet goal, regarded as the “holy grail” of apoptosis research (Youle & Strasser, 2008). There is a general consensus that in quiescent and healthy cells both BAX and BAK adopt an inactive monomeric state, where hydrophobic surfaces of key functional domains are maintained buried within the interior of the proteins, while at the same time, all (BAX) or most (BAK) of their mass is kept out of the membrane. According to currently popular models, upon receiving different apoptosis cues, specific BH3-only family members such as tBID and BIM directly interact with BAX and BAK to trigger profound structural rearrangements in both proteins that ultimately leads to their intramembranous oligomerization (Czabotar *et al.*, 2013; Kuwana *et al.*, 2002, 2005; Landeta *et al.*, 2011; Lovell *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2010; Terrones *et al.*, 2004). Moreover, recent high-resolution structural studies revealed analogous interaction surfaces between synthetic BID/BIM BH3 peptides and BAX/BAK (Czabotar *et al.*, 2013; Moldoveanu *et al.*, 2013). However, it remains unclear, whether BOK shares with BAX and BAK the explicit mechanistic underpinnings for its functional activation, including the possible participation of BH3-only proteins (Dewson *et al.*, 2012; García-Sáez, 2012; Gavathiotis & Walensky, 2011; Lamb & Hardwick, 2013; Shamas-Din *et al.*, 2013). Additionally, other recent information indicates that functional activation of BAX/BAK at the MOM level requires interaction with mitochondrial membrane lipids in addition to selected BH3-only proteins (Zhang & Saghatelian, 2013). Interaction with mitochondrial membrane lipids is indeed an important parameter to consider as the conformational rearrangements that many BCL2 family proteins apparently undertake to become functionally active occur in a lipid bilayer environment.

The major components of mitochondrial membranes are glycerolipids, and numerous studies showed that apoptosis induces specific changes in the glycerolipid composition of the mitochondria (Crimi & Esposti, 2011). Cardiolipin (CL) is a unique glycerol-based phospholipid, which is composed of two phosphate moieties and four acyl groups essentially restricted to linoleic acid. Although CL is usually considered to be a specific component of the MIM, the intramitochondrial location of CL is highly dynamic, and CL appears to accumulate at the MOM before BAX/BAK elicit the release of mitochondrial apoptogenic factors (Osman *et al.*, 2011). CL has even been shown to exit mitochondria and reach the plasma membrane in some models of apoptosis (Sorice *et al.*, 2004). Sphingolipids have also been shown to regulate the mitochondrial pathway of apoptosis. In particular, a link between elevated CER levels and BCL2-dependent



apoptosis has been documented not only in mammalian cells but also in *Caenorhabditis elegans* (Deng *et al.*, 2008), and a mitochondria-specific CER pool has been reported to alter the normal function of the organelle (Taha *et al.*, 2006). Moreover, mitochondrial CER accumulation apparently precedes BAX activation and MOMP, and during apoptosis BAX has been reported to localize in CER-containing macrodomains (Lee *et al.*, 2011; Martínez-Abundis *et al.*, 2009), as well as to act synergistically with so-called “CER channels” in MOM permeabilization (Ganesan & Colombini, 2010). Finally, using a series of *in vitro* and *in cellulo* assays, Chipuk *et al.* recently provided evidence that during apoptosis distinct sphingolipid metabolites accumulate at the mitochondria and cooperate with individual BCL2 proteins to elicit MOMP (Chipuk *et al.*, 2012). Specifically, BAX cooperated with hexadecenal (HEX) and BAK cooperated with sphingosine-1-phosphate (S1P) in cyt c release. Pure HEX reportedly bound to recombinant BAX with high affinity and was sufficient to induce BAX oligomerization, while analogous *in vitro* studies regarding BAK interaction with S1P were not described. Notwithstanding the above-described observations, a challenge still remains in obtaining a comprehensive picture of how apoptosis-related lipids cooperate with BCL2 proteins, in general. Moreover, to the best of our knowledge, the potential role played by specific mitochondrial lipids in BOK function has not been addressed so far.

Here we have examined whether and selected apoptosis-related lipids and BH3-only proteins trigger functional BOK activation. We used multiple approaches mainly applied to *in vitro* reconstituted systems, because of the complex network of intermolecular interactions that controls the BCL2-regulated MOMP pathway in intact cells. Our studies show that recombinant BOK $\Delta$ C6His directly and preferentially interacts with CL-rich model membranes. BOK $\Delta$ C6His associates with CL-rich liposomes, inserts into CL-rich monolayers, and increases the permeability of CL-rich GUV to a certain degree. In addition, we show that the BOK $\Delta$ C6His:CL interaction induces localized structural rearrangements in the protein, including its oligomerization. On the other hand, no clear evidence was obtained supporting the notion that selected BH3-only proteins can directly interact with BOK to trigger its functional activation, which is in stark contrast with the situation observed for the case of BAX/BAK.

### 3.3.2 MATERIALS AND METHODS

**Materials-** Egg phosphatidylcholine (PC), egg phosphatidylethanolamine (PE), bovine heart cardiolipin (CL), egg diacylglycerol (DAG), egg ceramide (CER), sphingosine-1-phosphate (S1P), were purchased from Avanti Polar Lipids. KCl, HEPES, EDTA, dodecyl octaethylene glycol monoether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>), octylglucoside (OG), alamethicin, tetanolysin, copper II sulphate (CuSO<sub>4</sub>),

FD10, allophycocyanine (APC), and phenantroline were obtained from Sigma (Cambridge, UK). Glycerol was purchased from VWR. Protease inhibitors were purchased from Roche. LB and TB were purchased from Teknovas. GST beads were purchased from Abtbeads. PreScission protease was purchased from GE Healthcare. Anti-BAK G23 polyclonal antibody was from Santa Cruz, and anti-BCLXL monoclonal antibody and anti polyHistidine monoclonal antibody were from Sigma. Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetalbovine serum and Penicylin-Streptomycin solution were purchased from Invitrogen. jetPRIME was purchased from Polyplus Transfection.

**Cell culture and transfection-** BAX<sup>-/-</sup>/BAK<sup>-/-</sup> DKO MEFs were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, U.S.A); supplemented with 10% fetalbovine serum (Invitrogen) and 1% Penicylin-Streptomycin solution (Invitrogen), in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Transfections were performed using jetPRIME (Polyplus Transfection), according to the manufacturers' instructions.

**Cytochrome-c release assays-** BAX<sup>-/-</sup>/BAK<sup>-/-</sup> DKO MEFs were homogenized with the vertical passing of 3 rounds of 20/15 and 10 strokes in a pre-cooled 5-ml glass-teflon potter Elvehjem homogenizer (Sigma-Aldrich), and a mitochondria-enriched fraction was obtained by differential centrifugation using the following mitochondrial isolation buffer (MIB): 210 mM Mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes (pH 7.5), 1 mM EDTA and freshly added protease inhibitors (Roche). Mitochondria were kept on ice and used within 2h of preparation. Isolated mitochondria (1 mg protein/ml) were incubated with recombinant proteins (500 nM BOKΔC6His, 5 nM BH3-only proteins) in 125 mM KCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, for 20 min at 30°C under constant stirring, using an Eppendorf Thermomixer (V<sub>final</sub>=50 μl). Reaction mixtures were centrifuged at 14000x g for 10 min. Supernatant fractions and pellet fractions were subjected to 15% SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-cytochrome-c 7H8.2C-12 antibody (Pharmingen).

**Recombinant protein expression and purification-** Recombinant full-length human BAX (BAX), recombinant human BAK lacking the carboxyl-terminal 21 aminoacids (BAKΔC), recombinant human BCL-XL lacking the carboxy-terminal 24 aminoacids (BCL-XLΔC), and recombinant caspase 8-cleaved murine BID were obtained as previously described. Recombinant human BOKΔC6His was expressed as C-terminal GST-tag fusion proteins and purified by affinity chromatography (Glutathion Sepharose beads, Abtbeads). All proteins were purified from soluble fractions of bacterial extracts, and were >90% pure as evaluated by Coomassie-stained SDS-PAGE. Protein concentration was determined from Bradford assay.

**Liposome preparation-** Unless otherwise indicated, liposomes were prepared with a lipid composition resembling that of MOM [(80 PC/20 PE (mol/mol)] (MOM-like liposomes) with or without apoptosis-related lipids replacing equivalent amounts of PC. Lipid mixtures at the indicated ratios were co-dissolved in chloroform/methanol (2:1), and organic solvents were removed by evaporation under an argon stream followed by incubation under vacuum for 2h. Multilamellar vesicles were next subjected to 10 freeze/thaw cycles. Unless otherwise specified, frozen/thawed liposomes were then subjected to sonication to obtain small unilamellar vesicles (SUVs) or extruded 10 times through polycarbonate filters with the desired pore diameter.

**Protein-Lipid Overlay Assay-** Stock solutions of different apoptosis-related lipids solubilized in 2:1:0.8 MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O were spotted onto Hybond C Nitrocellulose and allowed to dry. The strips were first blocked with 1% fat-free milk in PBS for 1 hour and incubated for 1 more hour with BOKΔC6His, BAKΔC or BCL-XLΔC (20 nM protein) in PBS at 37°C. The strips were washed 3 times, 10 min each with PBS and soaked in 1% fat-free milk in PBS with an anti-polyHistidine monoclonal, anti-BAK polyclonal G23, or anti-BCL-XL antibody at 1:2.000 dilution for an hour at room temperature. The strips were washed twice with PBS and soaked in 1% fat free milk in PBS with horse radish peroxidase-conjugated anti mouse antibody (Bio-Rad, Hercules, CA) at 1:10.000 dilution for an hour at room temperature. Following washing with PBS 3X10 min at room temperature, the protein was detected by chemiluminescence. When indicated, protein bands were digitalized and integrated densities measured using Quantity One software. No detergent was added in any of the steps described for protein-lipid overlay assays, to avoid any possible detergent-induced artifactual changes in BOKΔC6His, BAKΔC21 or BCLXLΔC24 protein conformation.

**Equilibrium sucrose gradient centrifugation of liposomes-** Liposomes (1 mM) and BCL2 proteins (1 μM) were co-incubated at a lipid to protein ratio of 500 for 1 h at 37 °C in buffer KHE (100 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.4 and 1mM EDTA). A fraction of the sample (150 μl) was adjusted to a final sucrose concentration of 2.4 M (final volume of 300 μl), overlaid with 400 μl of 0.8 M sucrose, and finally 300 μl of 0,5 M sucrose. Gradients were centrifuged at 4°C or 3 h at 100,000 rpm in an Optima TLX benchtop ultracentrifuge (Beckman Coulter, CAL, U.S.A), using a TLA 120.2 rotor. The top two fractions collected from the gradient correspond to the lipid-containing fractions and contain any membrane-associated protein, whereas the bottom two fractions contain the remainder of the non-targeted protein. The samples (25μl) were run on SDS-PAGE gels and then transferred to a nitrocellulose membrane for western blot analysis.

**Surface pressure measurements-** Measurements were carried out with a MicroTrough-S system from Kibron (Helsinki, Finland) at 37 °C with constant stirring. The lipid, dissolved in chloroform, was gently spread over the surface and kept at a constant surface area. The desired initial surface pressure,  $\pi_i$ , was attained by changing the amount of lipid applied to the airwater interface. After 10 min to allow for solvent evaporation, the protein (150 nM) was injected through a hole connected to the subphase. The change in surface pressure,  $\Delta\pi$ , was recorded as a function of time until a stable signal was obtained. The subphase buffer was 1.0 mL of KHE buffer (pH 7.0). The linear plot of  $\Delta\pi$  as a function of  $\pi_i$  can be extrapolated to a  $\pi_i$  of 0 to give the critical pressure,  $\pi_c$ , which is a measure of the relative “penetration capacity” of a protein into the monolayer.

**BOK $\Delta$ C6His cross-linking assays-** BOK $\Delta$ C6His (200 nM) was incubated with LUV (100  $\mu$ M) for 20 min in 100  $\mu$ l, followed by addition of the amine-reactive disuccinimidyl suberate (DSS) or Cuphecross-linker at 0.2 mM concentration, and further incubation of samples for 30 min at room temperature. Cross-linker was quenched by addition of 0.1 volume of 2M Tris-HCl (pH 7.4) in the case of DSS and 20 mM EDTA plus 20 mM N-ethylmaleimide in the case of CuPhe. Finally, samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-polyHistidine monoclonal antibody (Sigma Aldrich).

**Far-UV circular dichroism (CD) measurements-** Far-UV CD spectra were recorded at 37°C on a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Spectroscopic Co. Ltd., Hachioji City, Japan) equipped with a JASCO PTC-423S temperature control unit, using a 1-mm pathlength cell. Data were collected every 0.2 nm at 50 nm/min from 250 nm to 200 nm, with a bandwidth of 2 nm, and results were averaged from 20 scans. All samples were allowed to equilibrate for 10 min prior to CD analysis. Each spectrum represents the average of three distinct spectral recordings. The contribution of buffer with/without liposomes to the measured ellipticity was subtracted as blank. Molar ellipticity values were calculated using the expression  $[\theta] = \theta / 10 \cdot l \cdot n^2 \cdot c$ , where  $\theta$  is the ellipticity (millidegrees),  $c$  is the protein concentration (moles per liter),  $l$  is the cuvette path length, and  $n$  is the number of peptide bonds in the protein. To assess the protein thermal stability, sample components were incubated for 1h in KHE buffer at 37°C prior to beginning of measurements. The midpoint of the melting transition ( $T_{1/2}$ ) was estimated using the first derivative converter available in the software of the CD instrument with a window of 9 data points and a 2<sup>nd</sup> degree polynomial smoothing.

**Fluorescence spectroscopy-** Steady-state fluorescence measurements were taken using an SLM 8100 photon-counting spectrofluorimeter with a double monochromator in the excitation

light oath, a single emission monochromator, cooled PMT housings, and a 450W xenon lamp (Spectronic Instrument, Rochester, NY). For Trp measurements, excitation wavelength was 295 nm, the band pass was 4nm, and emission spectra of Trp were measured from 300 nm to 400 nm/s, at a rate of 1 nm/s, with the experiment conducted at room temperature. Corrections were made for the appropriate blanks and for the wavelength-dependent bias of the optical and detection systems

**Molecular modeling-** Structures were downloaded from the PDB (<http://www.rcsb.org>); molecular drawings were made with PyMOL (<http://www.pymol.org>).

**GUV assays-** Giant unilamellar vesicles (GUVs) were produced by electroformation (García-Sáez *et al.*, 2009). Briefly, 3  $\mu$ L of 0.5:0.2:0.3:0.02 PC: PE: CL: Rho-PE at 1 mM in chloroform, were spread on platinum wires of the electroformation chamber. After solvent evaporation, the wires were immersed in 200 mM sucrose and electroformation proceeded at RT for 1h at 2.5V/10 Hz followed by another half an hour at 2.5 Hz to ensure proper detachment of the GUVs from the wires. Allophycocyanin (0.25  $\mu$ M), 1KDa Alexa-488 Dye (0.25  $\mu$ M) and BCL2 proteins (0, 30, 100 or 300 nM) in 200 mOsm KHE buffer were mixed in a Lab-Tek eight-chambered No. 1.0 borosilicate coverglass (Nalge Nunc International, Rochester, NY), previously blocked with 10 mg/mL fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). GUVs were added to the sample at a ratio of 80/320  $\mu$ l. The sucrose suspension was gently mixed in the electroformation chamber (The end of a micropipette tip is cut to widen the opening and to avoid rupture of GUV in suspension) and then GUVs are added slowly on the top of the buffer in the observation chamber, and after 5-10 min GUV were sedimented. Then the observation chamber was placed on the confocal fluorescence microscopy. The excitation wavelength for Rho-PE was 561 nm and the images were collected using a band-pass filter of  $593 \pm 40$  nm. In the case of APC, an excitation wavelength at 637 nm was used, and images were collected using a long-pass filter of 650 nm. Alexa-488 was excited at 488 nm and images were collected using a band-pass filter of  $515 \pm 31$  nm. Images were processed with ImageJ. At least, a hundred of GUVs were analyzed per each experimental condition.

**Blue-Native gels-** Proteins (5  $\mu$ M) were incubated 30 mi at RT with peptides (5  $\mu$ M). Loading buffer (100 mM Tris pH 8, 30% glycerol, 15%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5% Coomassie Blue G) was added to the sample. Then, Cathode (100 mM Histidine, Tris-HCl pH 8, 0.002% Coomassie Blue G and 100 mM Histidine, Tris-HCl pH 8) and anode (100 mM Tris-HCl pH 8.8) buffers were prepared. The sample was loaded onto the freshly made native gel. Running tank was filled with cathode buffer between the gel glass sandwich and the anode buffer in the outer part of the tank. During electrophoresis, charged samples enter the stacking gel. Once the Coomassie covered one half of the gel proteins start to be visible and the blue cathode buffer was replaced

by the colorless cathode buffer. Electrophoresis was stopped when the Coomassie stained front reached the end of the gel.

**Pull-down assay-** GSTBOK $\Delta$ C6His protein was incubated with 50  $\mu$ l of GST beads (Qiagen) in 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH8), 1% CHAPS and 10% glycerol followed by centrifugation to sediment the proteins bound to the beads. After washing the beads with reaction buffer (binding buffer without CHAPS), bead-bound proteins were incubated with target proteins in KHE buffer during 30 min at 37°C. The reaction mixture was centrifuged and bound proteins were separated from non-bound proteins by centrifugation. The eluates were analyzed by SDS-PAGE to assess the binding of proteins.

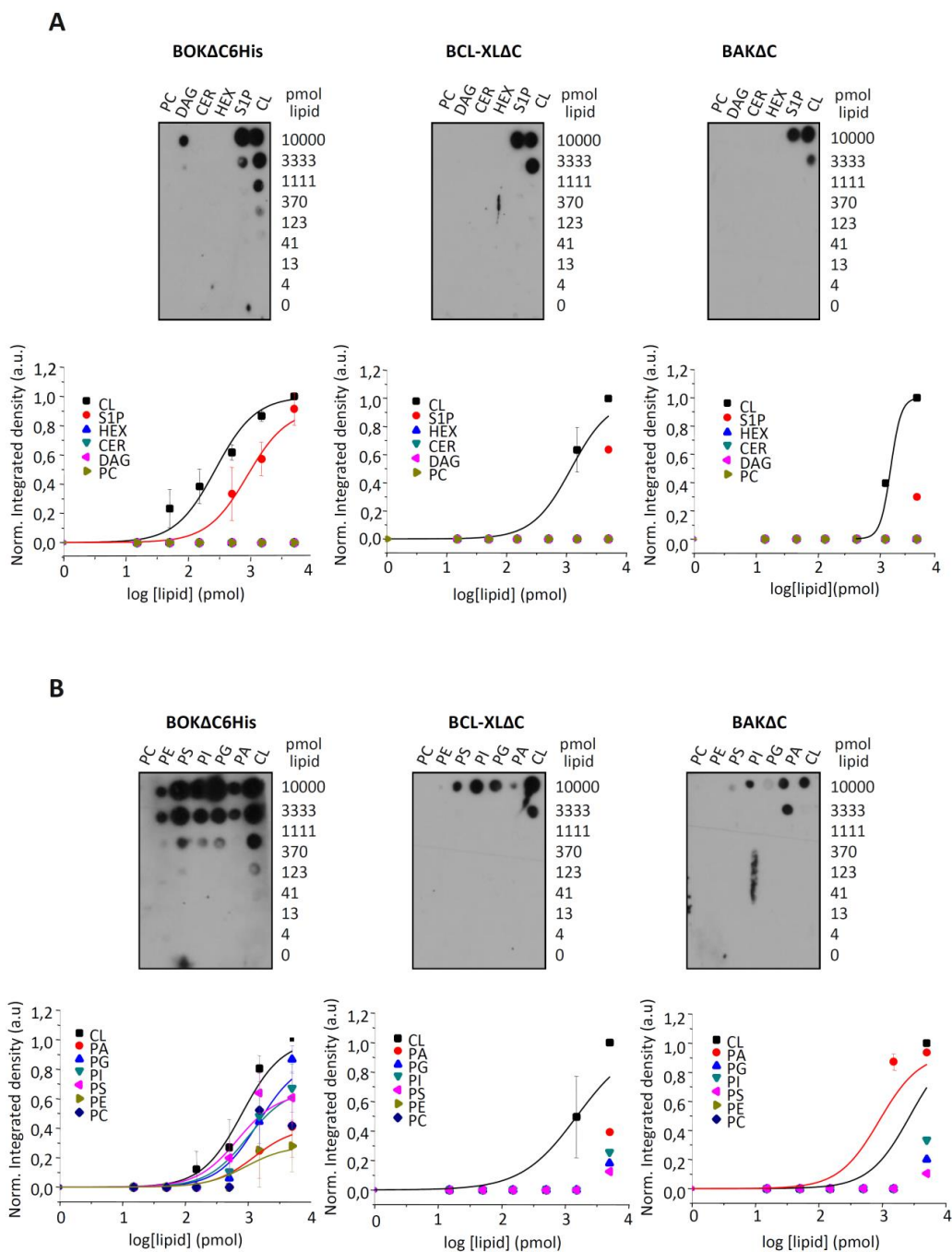
### 3.3.3 RESULTS

#### 3.3.3.1 BOK $\Delta$ C6His interacts with CL-rich model membranes

Evidence gathered during the last decade has implicated a variety of lipids in the BCL2 regulated MOM permeabilization pathway; most prominently, the glycerolipid cardiolipin (CL), and the sphingolipids ceramide (CER), hexadecenal (HEX), and sphingosine-1-phosphate (S1P)(Chipuk *et al.*, 2012; Kuwana *et al.*, 2002). Thus, we decided to examine the ability of recombinant BOK $\Delta$ C6His to interact with these major apoptosis-related lipids. As an initial test to examine whether BOK $\Delta$ C6His physically associates with apoptosis-related lipids, direct binding studies were carried out using the lipid dot-blot overlay method. As negative controls, we used the apoptosis-unrelated glycerolipids PC and DAG, which are also present at the MOM. In addition, we also examined the lipid-interacting abilities of recombinant BCL-XL $\Delta$ C and BAK $\Delta$ C.

In this approach, nitrocellulose filters were spotted with defined quantities of pure lipids, and binding was examined by incubation with purified recombinant proteins, followed by immunostaining with anti-polyHistidine (BOK $\Delta$ C6His), anti-BCL-XL and anti-BAK antibodies, respectively. Of the six lipids tested, BOK $\Delta$ C6His exclusively bound to CL in a dose-dependent and saturable manner (Figure 1A, Left Top), while BCL-XL $\Delta$ C and BAK $\Delta$ C only bound to CL at the highest concentration tested (Figure 1A Middle Top, and Right Top). Semi-quantitative analysis of immunoblots from multiple experiments confirmed that BOK $\Delta$ C6His bound CL with higher potency than BCL-XL $\Delta$ C or BAK $\Delta$ C (Figure 1A, Bottom). Further experiments were carried out to try determining the degree of specificity of the BOK $\Delta$ C6His:CL interaction relative to other lipids present at the MOM, as well as to try distinguishing whether BOK $\Delta$ C6His binds CL due to the net negative electric charge of this lipid or due to its intrinsic negative curvature. As shown in Figure 1B, BOK $\Delta$ C6His bound measurably to the MOM lipids PA/PG/PI/PS which display net negative

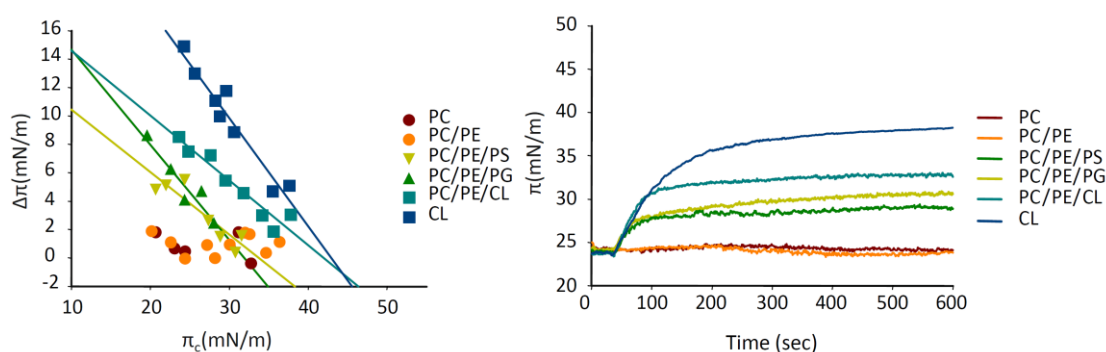
charge, as well as to the MOM lipid PE displaying negative intrinsic curvature. However, all of these MOM lipids bound BOK $\Delta$ C6His with lower potency than CL. Thus, we concluded that BOK $\Delta$ C6His recognizes CL with a preference over other MOM lipids, and that the BOK $\Delta$ C6His:CL interaction is not exclusively due to CL electric charge or intrinsic curvature.



**Figure 1. Lipid dot-blot assay reveals preferential interaction of BOK $\Delta$ C6His with mitochondrion-specific lipid CL.** Increasing amounts of indicated lipids were spotted on nitrocellulose membranes and were incubated with 20nM of recombinant proteins. The blots were then washed and probed with appropriate monoclonal antibodies. For quantitation integrated protein immunoreactivity was then measured at each

spot and normalized for each lipid, and the data were fitted with a sigmoidal dose-response nonlinear regression model. Each curve represents the average and  $\pm$ S.E. of at least three independent experiments.

To further characterize the ability of BOKΔC6His to interact with different mitochondrial anionic lipids, we carried out experiments with lipid monolayers using a Langmuir balance. In these experiments, the increase in surface pressure ( $\Delta\pi$ ) upon BOKΔC6His addition was measured as a function of the initial surface pressure ( $\Delta_0$ ). For all compositions containing anionic lipids, as the initial surface pressure of the monolayer is increased, the change in surface pressure upon BOKΔC6His addition decreased (Figure 2). The data are fitted to a straight line, and the x-intercepts correspond to the monolayer critical surface pressure ( $\pi_c$ ). The values of  $\pi_c$  were highest for monolayers containing 33% or 100% CL (42.5 and 42.7 mN/m, respectively), while markedly lower values were obtained for monolayers containing PG (32.31 mN/m) and PS (34.44 mN/m). The critical surface pressure is a measure of the penetration capacity of a protein entering a monolayer: if this pressure exceeds 30-35 mN/m, then the protein is assumed to be capable of membrane insertion. Thus, our data clearly indicate that BOKΔC6His inserts at least part of its mass in CL-containing monolayers.



Lipidic composition	$\pi_c$ (mN/m)
PC	-
PC/PE	-
PC/PE/PS	34.44
PC/PE/PG	32.31
PC/PE/CL	42.5
CL	42.7

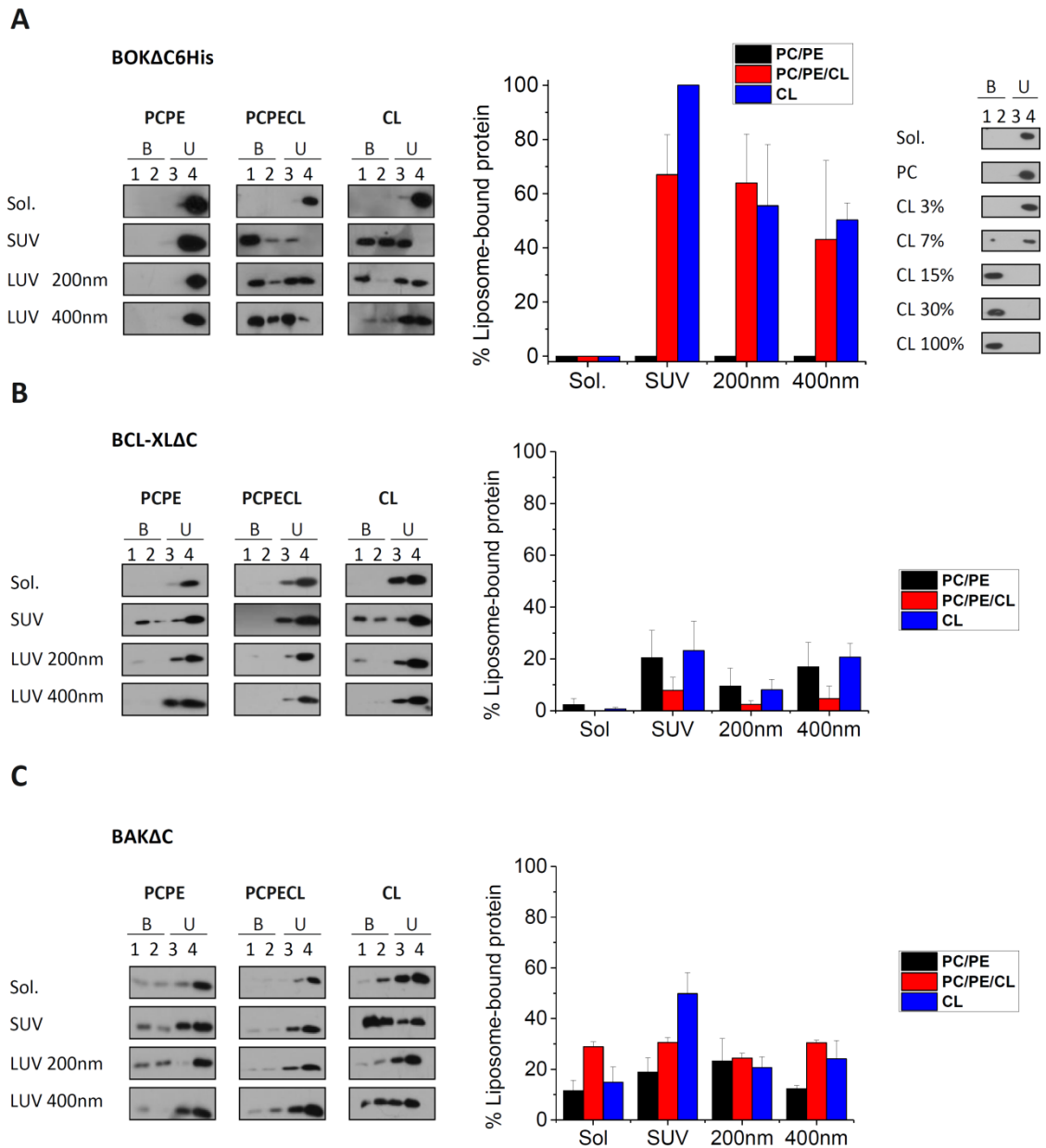
**Figure 2. Analysis of BOKΔC6His insertion into lipid monolayers of different lipid compositions.** Changes in surface pressure ( $\Delta\pi$ ) of lipid monolayers of indicated lipid compositions were measured as a function of the initial surface pressure ( $\pi_0$ ), after addition of 150 nM BOKΔC6His to the subphase. The data are fitted to a straight line, and the intercepts with the x axis define the monolayer exclusion pressure ( $\pi_c$ ), which is a measure of the membrane penetrability of the protein. Each point represents the average of three independent experiments.



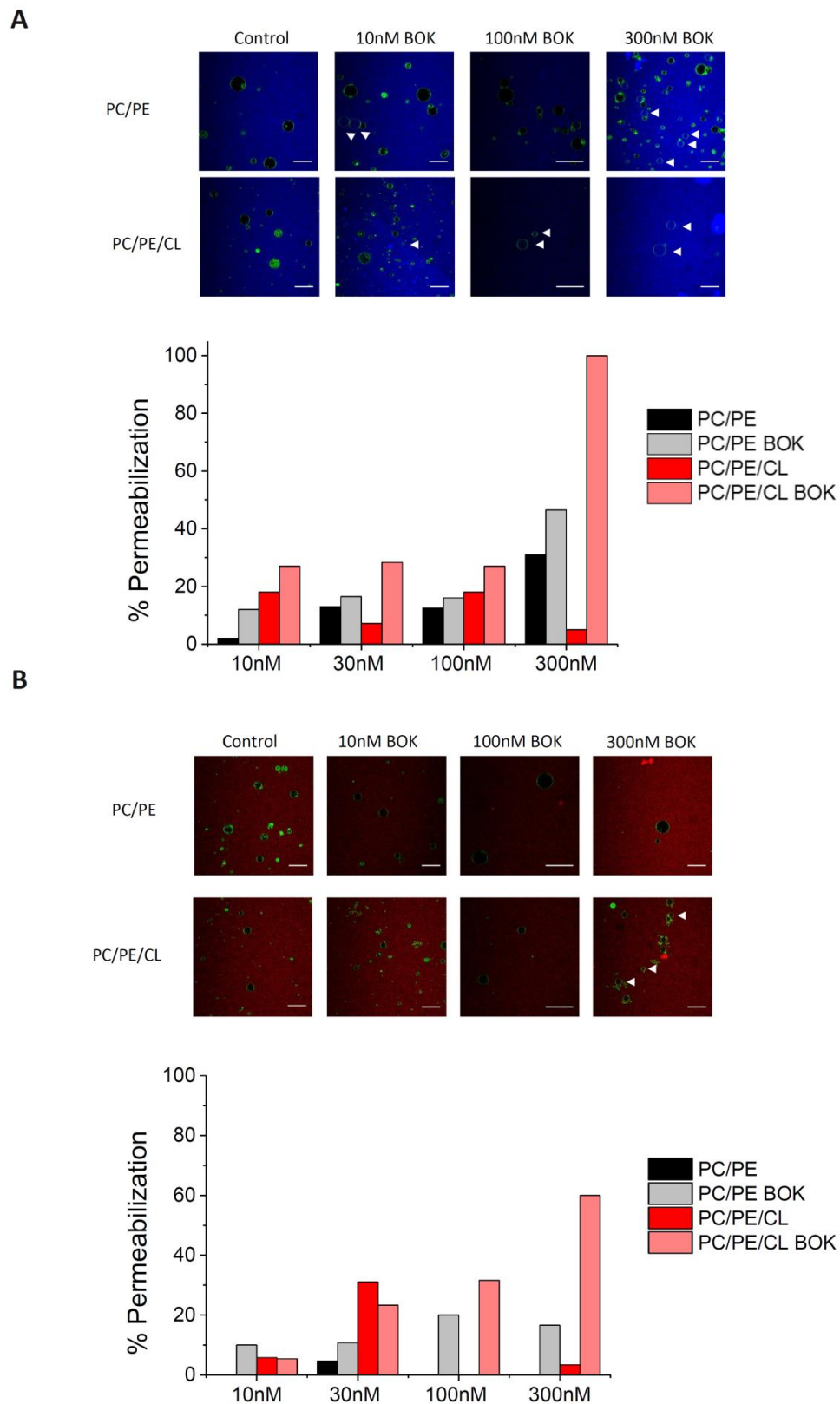
In a third set of experiments, liposome lipid-binding assays were performed. Based in the results obtained in the dot-blot experiments, the same three purified recombinant proteins were incubated with lipid vesicles having a defined membrane composition containing or lacking CL. We examined vesicles of differing sizes that thereby display different degrees of curvature. Protein association with the liposomes was assessed by their ability to float with the vesicles after equilibrium sucrose gradient centrifugation. Equivalent amounts of the top (T) and bottom (B) fractions of the gradient were then subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. As shown in Figure 3A Left, the amount of BOK $\Delta$ C6His recruited to the liposomes differed markedly depending on the incorporation of CL in the vesicle. Densitometric quantitation of the individual signals confirmed that BOK $\Delta$ C6His did not bind to CL-devoid PC/PE (1/1) liposomes, while the protein displayed strong binding to CL-rich liposomes irrespective of liposome curvature (Figure 3A). On the contrary, BCL-XL $\Delta$ C was found almost exclusively in the bottom fraction of the gradient after incubation with both CL-devoid and CL-rich liposomes indicating BCLXL $\Delta$ C does not bind efficiently to any type of vesicle examined (Figure 3B). In the case of BAK $\Delta$ C, the protein only displayed significant binding to pure CL SUV (Figure 3C).

To sum up, results obtained using three independent lipid-interaction assays (lipid dot-blot, liposome floatation and lipid monolayer surface pressure measurements) all concur in showing that BOK $\Delta$ C6His interacts preferentially with CL-rich membranes, compared to membranes containing other mitochondrial lipids.

Next, the membrane-permeabilizing activity of BOK $\Delta$ C6His was analyzed. To this aim, we used Giant Unilamellar Vesicles (GUV) and fluorescence microscopy. Specifically, CL-less or CL-rich GUV were prepared, followed by visualization of the entry into single GUV of two differently-sized fluorescent molecules:  $\approx$ 1kDa Alexa 488 dye (Figure 4A) and  $\approx$ 100kDa fluorescent allophycocyanine (APC) (Figure 4B). Initially, the vesicles were added to a buffer containing Alexa/APC together with different concentrations of BOK $\Delta$ C6His. After incubating the mixture for 1 hour with  $\geq$  300nM of BOK $\Delta$ C6His, a prominent increase was observed in the amount of Alexa dye incorporated into CL-rich, but not into CL-less GUV (Figure 4A). In control experiments, GUV treated with BOK $\Delta$ C6His buffer showed little Alexa internalization. Importantly, BOK $\Delta$ C6His induced internalization of APC into GUV to a lower degree than Alexa488, suggesting the protein forms a membrane permeability pathway of relatively small size. Treatment with BOK $\Delta$ C6His did not produce large-scale morphological alterations in the GUV (fusion, fragmentation, or macroscopic domain formation) consistent with a pore-forming mechanism of membrane permeabilization. It is noteworthy that under these experimental conditions, MCL1 $\Delta$ C and BAK $\Delta$ C alone had negligible effect on GUV permeability (Bleicken *et al.*, 2013b).



**Figure 3. Analysis of BOK $\Delta$ C6His binding to liposomes by sucrose float-up.** Indicated proteins (1  $\mu$ M) and liposomes (1 mM) were incubated together and protein recruitment to the vesicles was assessed by its ability to float with liposomes after equilibrium sucrose gradient centrifugation. Equivalent amounts of the top (T) and bottom (B) fractions were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using monoclonal antibodies. In the Right panels, the percentage of protein bound to liposomes was determined by densitometry. Data is shown as mean and  $\pm$ S.E., n=2-5 independent experiments.



**Figure 4. Effect of BOK $\Delta$ C6His in GUV permeability. A) Top:** Representative images of GUV of indicated lipid compositions incubated for 2 hours in the absence or presence of BOK $\Delta$ C6His together with Alexa488 dye (250 nM). Scale bar is 50 $\mu$ m. **Bottom:** Quantitation of BOK $\Delta$ C6His-induced GUV permeabilization (n>100). Arrowheads indicate permeabilized GUVs. **B) As in A,** but APC was used instead of Alexa 488-dye.

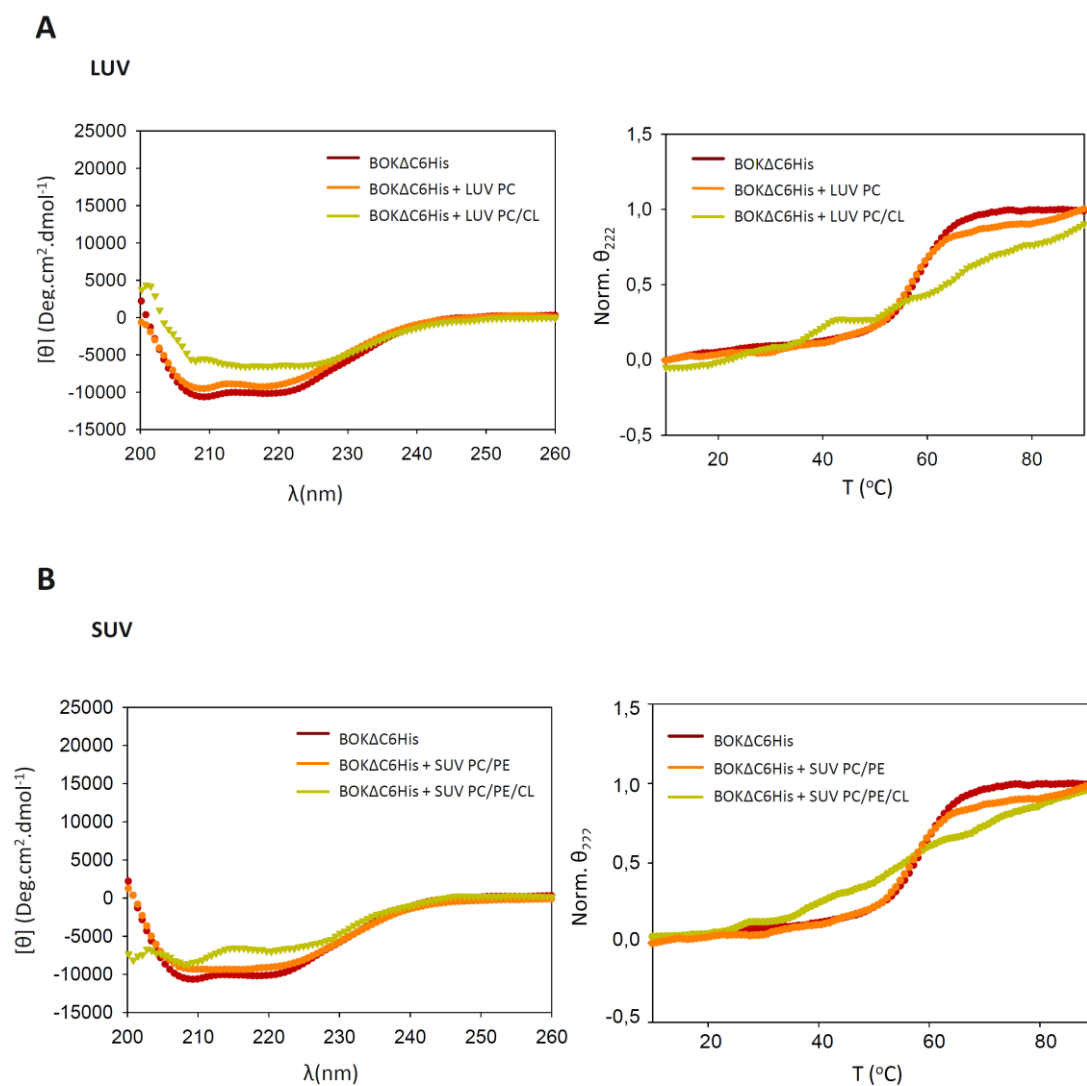
### 3.3.3.2 CL interaction produces localized structural changes in BOK $\Delta$ C6His

We next tested for lipid-induced structural changes in BOK $\Delta$ C6His. Far-UV CD spectroscopy was used for the initial biophysical characterization of the interactions between BOK $\Delta$ C6His and CL. The far-UV CD spectrum reports primarily on the secondary structure of a protein, and for BOK $\Delta$ C6His in solution revealed prominent absorption minima at 208 and 222 nm typical of a well-folded helical bundle protein (Figure 5A, Left). The presence of PC LUV did not induce pronounced changes in the far-UV CD spectrum of BOK $\Delta$ C6His, but PC/CL LUV produced a marked increase in light scattering that precluded appropriate interpretation of the CD spectra. To try diminishing scattering contribution, CL-rich SUV were used but despite their smaller size, this type of liposomes still produced considerable scattering. Nevertheless, judging from overall shape of the spectra we may conclude that CL-rich vesicles did not produce profound changes in BOK $\Delta$ C6His secondary structure (Figure 5B, Left).

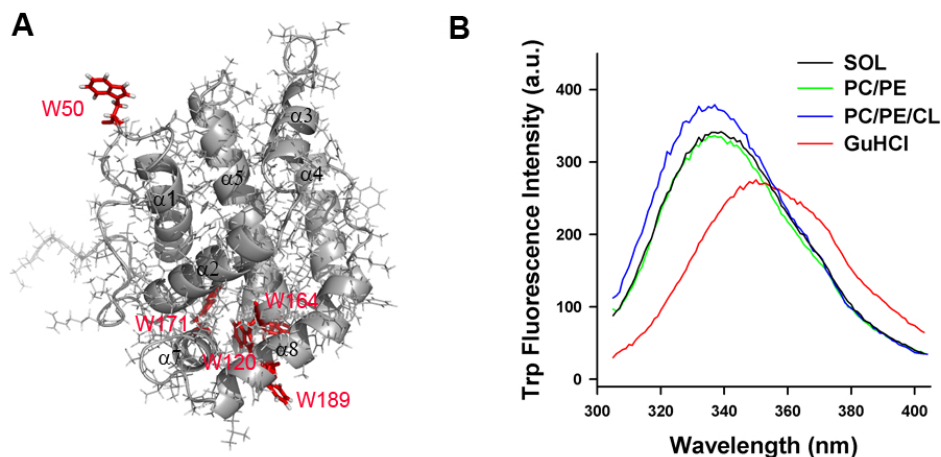
To explore by CD whether binding to CL produces changes on BOK $\Delta$ C6His tertiary structure, the conformational stability of the protein was analyzed. Specifically, BOK $\Delta$ C6His unfolding in the presence or absence of liposomes was monitored as a function of temperature by the change in its ellipticity at 222 nm (Figure 5, Right). The thermally-induced melting curve of BOK $\Delta$ C6His in solution showed a cooperative unfolding transition with pronounced loss of helicity occurring between 50°C and 60°C. Importantly, upon incubation with PC/PE/CL (1/1/1) LUV or SUV the thermal unfolding curve of BOK $\Delta$ C6His exhibited less cooperativity indicating that CL-rich liposomes significantly change the BOK $\Delta$ C6His solution fold (Figure 5, Right).

To further examine the effect of apoptosis-related lipids on BOK $\Delta$ C6His tertiary structure, we measured changes in the tryptophan (Trp) emission spectrum of the protein. BOK $\Delta$ C6His contains 5 Trp residues (Figure 6A). In solution, the average Trp fluorescence emission of BOK $\Delta$ C6His displayed a maximum value (Trp  $\lambda_{em(max)}$ ) of  $\approx$ 337 nm. The addition of PC/PE/CL (1/1/1) LUV liposomes gave rise to small but reproducible changes in BOK $\Delta$ C6His fluorescence spectrum consisting of a  $\approx$ 3-4nm blue shift in Trp  $\lambda_{em(max)}$  accompanied by a  $\approx$ 1.2-1.3 fold increase in Trp fluorescence intensity. The blue shift in Trp  $\lambda_{em(max)}$  and the increase in Trp fluorescence intensity indicate a net shift of BOK $\Delta$ C6His Trp residues towards a more non-polar environment on binding to CL-rich vesicles. In contrast, the BOK $\Delta$ C6His Trp fluorescence spectrum remained virtually unaltered in the presence of CL less liposomes. When BOK $\Delta$ C6His was incubated with 6M Guanidinium Hydrochloride (GuHCl) which leads to protein denaturation, we observed changes in BOK $\Delta$ C6His Trp fluorescence that were markedly different from those elicited by PC/PE/CL liposomes (Figure 5B). These results strongly suggest that binding to CL-

rich membranes causes localized structural rearrangements in BOK $\Delta$ C6His that are distinct from the global structural changes associated with full denaturation of the protein.



**Figure 5. Effect of CL on BOK $\Delta$ C6His structure assessed by CD. A, B) Left panels:** Far-UV CD spectra of BOK $\Delta$ C6His (4 $\mu$ M) in the absence or presence of indicated liposomes (1 mM) converted to mean molar residue ellipticity. **Right:** Thermal denaturation curves for BOK $\Delta$ CHis in the absence or presence of indicated liposomes. Denaturation curves were obtained by recording the temperature dependence of BOK $\Delta$ C6His ellipticity at 222 nm.



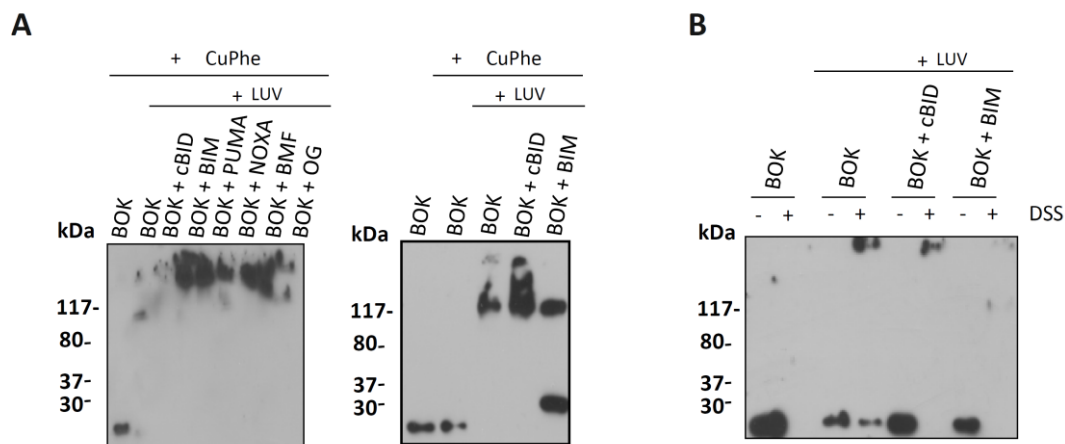
**Figure 6. Tryptophan fluorescence analysis of BOK $\Delta$ C6His conformation.** **A)** Structural model of BOK $\Delta$ C6His generated in PyMol displaying the tryptophan (W) residues that served as spectroscopic probes of protein conformational changes in the presence of liposomes. **B)** Representative tryptophan fluorescence spectra of BOK $\Delta$ C6His (200 nM) incubated for 20 min in the absence of liposomes, in the presence of MOM-like liposomes containing 20% apoptosis-related lipids (1 mM), in the presence of 2% octylglucoside (OG), or in the presence of 6 M guanidinium hydrochloride (GUHCl). In all cases, 200 nM protein was excited at 295 nm and the fluorescence spectra were collected from 310 nm to 450 nm.

The observations from CD and fluorescence taken together indicate that BOK $\Delta$ C6His undergoes a localized conformational change upon shifting from solution to CL-rich membranes. This membrane conformation appears to have stable 2° structure, but a more unfolded 3° structure than the solution conformation.

### 3.3.3.2 BH3-only proteins do not interact physically or functionally with BOK

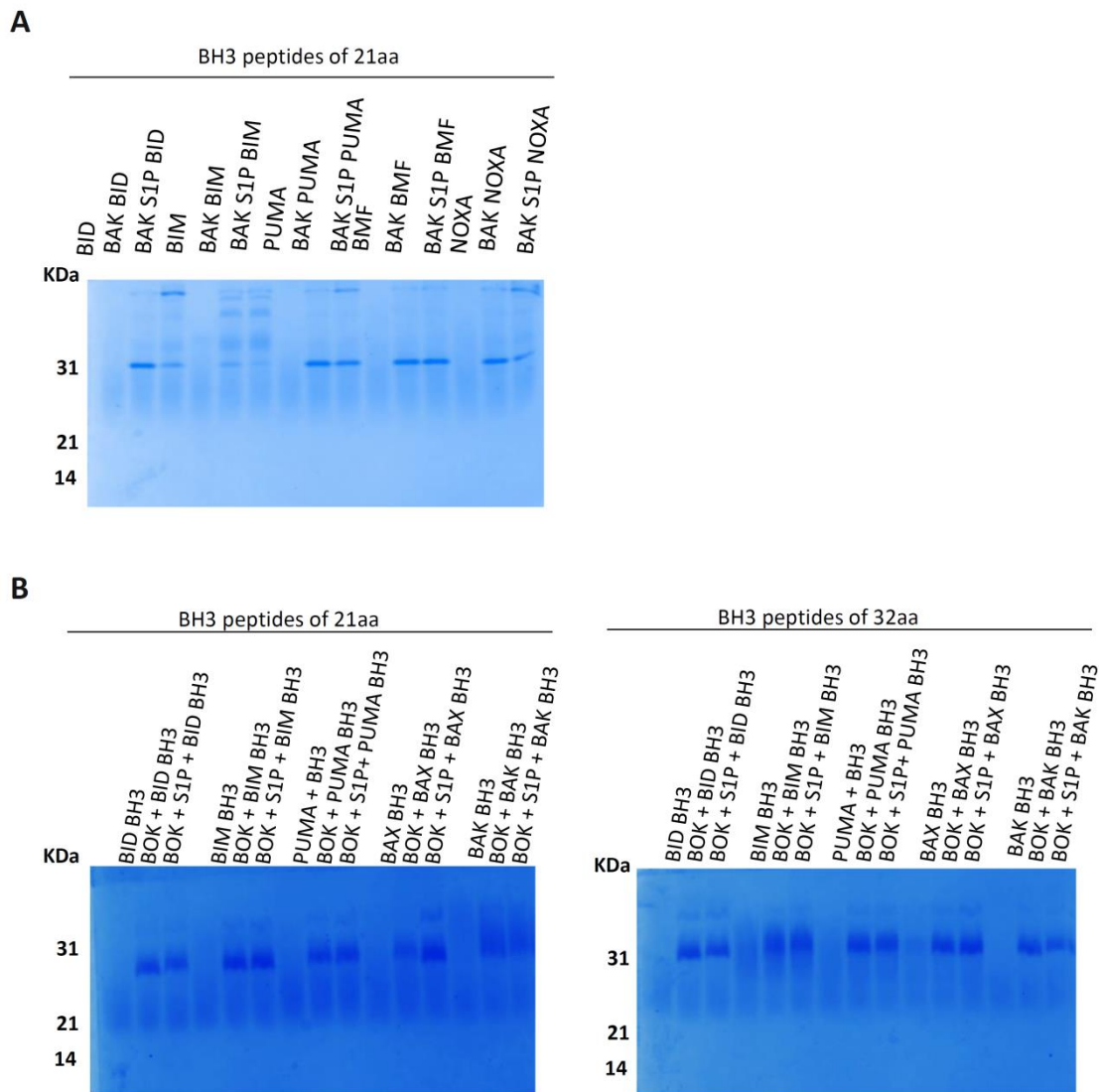
For BAX and BAK, it is widely believed that oligomerization and membrane permeabilization are linked, although exactly how the two processes are linked remains unclear. However, multiple lines of evidence indicate that selected BH3-only proteins (i.e. cBID and BIM) are necessary for triggering oligomerization of and membrane permeabilization by BAX and BAK. Thus, we next tested whether interaction with CL-containing membranes and/or BH3-only proteins trigger BOK $\Delta$ C6His oligomerization. To this aim, BOK $\Delta$ C6His was incubated with liposomes containing CL and/or indicated BH3-only proteins, followed by treatment with chemical cross-linkers and detection of BOK $\Delta$ C6His monomers/oligomers by SDS-PAGE and immunoblotting. As shown in Figure 7A, when BOK $\Delta$ C6His was incubated with CuPhe or DSS cross-linkers in solution, either a  $\approx$ 25 KDa band corresponding to monomeric BOK $\Delta$ C6His appeared or the BOK $\Delta$ C6His signal

disappeared, the latter effect presumably being due to unspecific aggregation of the protein. By contrast, when BOK $\Delta$ C6His was incubated with CL-rich liposomes alone followed by treatment with cross-linkers, the  $\approx$ 25 kDa band corresponding to monomeric BOK $\Delta$ C6His disappeared and multiple high-molecular bands corresponding to oligomerized BOK $\Delta$ C6His appeared (Figure 6A). Importantly, BH3-only proteins alone or together with CL-rich membranes did not produce significant alterations in BOK $\Delta$ C6His quaternary structure assessed by cross-linking and SDS-PAGE (Figure 6B).



**Figure 7. Chemical cross-linking analysis of BOK $\Delta$ C6His oligomerization. A)** BOK $\Delta$ C6His (200 nM) was subjected to indicated treatments with PC/PE/CL liposomes (100  $\mu$ M), BH3-only proteins (50 nM) and CuPhe cross-linker (200  $\mu$ M), followed by SDS/PAGE and immunoblot analysis of BOK $\Delta$ C6His content using anti-polyHistidine monoclonal antibody (1:2000). **B)** Same as in A, but with using DSS as cross-linker.

Recent studies indicate that BAX and BAK form symmetric homodimers as intermediates in the molecular pathway leading to their full activation (Czabotar *et al.*, 2014). Formation of such BAX/BAK dimers can be triggered by BID/BIM BH3 peptides in recombinant BAX $\Delta$ C and BAK $\Delta$ C in the presence of CHAPS, and has been successfully monitored by blue native PAGE analysis (Brouwer *et al.*, 2014; Czabotar *et al.*, 2013). Thus, we decided to analyze whether BH3 peptides can trigger BOK $\Delta$ C6His dimerization in the presence of CHAPS. We also wished to examine whether the apoptosis-related lipids S1P compatible with the blue native PAGE analysis can replace CHAPS in triggering BOK $\Delta$ C6His dimerization in the presence of BH3 peptides. We succeeded reproducing BAK $\Delta$ C dimerization by the 21mer BID BH3 plus CHAPS combination as published recently (Brouwer *et al.*, 2014) (Figure 8A). However, despite numerous attempts, we failed to detect BOK $\Delta$ C6His dimerization by blue native PAGE in the presence of different BH3 peptides either alone or combined with CHAPS or S1P (Figure 8B).

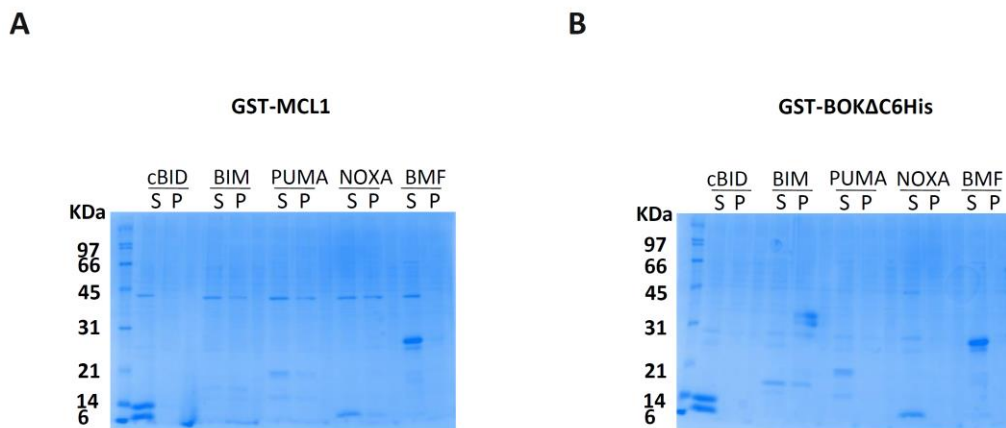


**Figure 8. Blue native PAGE. A)** Blue native page of BAK $\Delta$ C6His showing dimerization with selected 21mer BH3 peptides including BID BH3 plus CHAPS. **B)** Blue native page for BOK $\Delta$ C6His showing lack of dimerization of this protein in presence of some 21mer or 32mer BH3 peptides plus CHAPS or S1P.

In a subsequent set of experiments we performed pull-down assays to assess the ability of BOK $\Delta$ C6His to interact with BH3-only proteins. Here, GST-MCL1 $\Delta$ C or GST-BOK $\Delta$ C6His proteins were immobilized onto GST beads followed by incubation with indicated BH3-only members for 30 min at 37°C. After throughout washing, beads were collected by centrifugation and bound proteins were eluted with glutathione and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using specific antibodies (Figure 9). In agreement with previous data obtained with BH3 peptides (Chen *et al.*, 2005), detectable amounts of BIMs, NOXA, and PUMA appeared bound to GST-MCL1 $\Delta$ C validating the pull-down assay (Figure 9A). Contrastingly, no significant interaction was



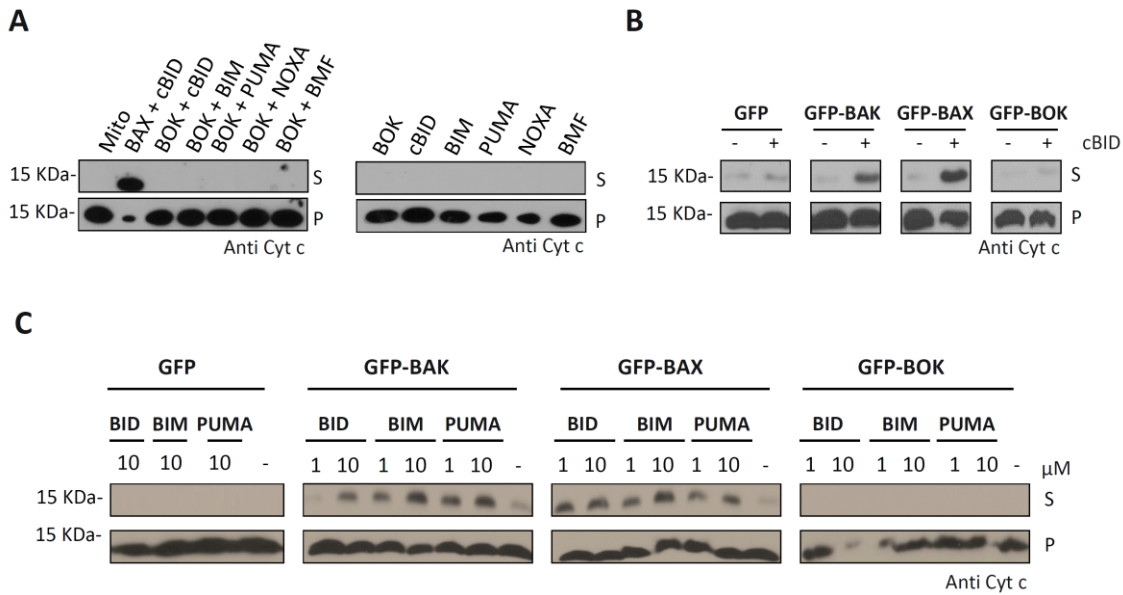
detected in solution between BH3-only proteins and GST-BOK $\Delta$ C6His, except for a small amount of binding detected with BIMs (Figure 9B).



**Figure 9. Binding of GST-BOK $\Delta$ C6His and GST-MCL1 $\Delta$ C in solution.** Indicated 6 His-tagged BH3-only proteins (500 nM) were immobilized on glutathione beads and were incubated with equimolar concentrations of indicated multidomain BCL2 proteins for 30 min at 37°C. After extensive washing, samples were subjected to centrifugation and supernatant (S) and pellet (P)-corresponding fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-polyHistidine antibodies.

Finally, we examined whether BH3-only proteins can interact with BOK in the context of a mitochondrial membrane environment. To this aim, we first incubated BOK $\Delta$ C6His and BH3-only proteins together with isolated BAX/BAK DKO mitochondria, and assessed whether these treatments produce release of cyt c from the organelles. As shown in Figure 10A, none of the protein combinations induced detectable mitochondrial cyt c release. By contrast, incubation of the same BAX/BAK DKO mitochondria with BAX+cBID led to extensive cyt c release, as expected.

Next, we examined whether full-length cBID or relevant BH3 only peptides can trigger cyt c release when they are added to semi-intact BAX/BAK DKO cells overexpressing GFP-BOK (full-length). As shown in Figure 10B and C, BAX/BAK DKO ectopically expressing GFP-BOK and treated with cBID or BH3 peptides did not release significant amounts of cyt c. Contrastingly, incubation of GFP-BAX and GFP-BAK overexpressing cells with cBID or BID/BIM/PUMA BH3 peptides released readily detectable amounts of cytochrome c.



**Figure 10. In a mitochondrial membrane environment, BH3-only proteins and peptides that activate BAX/BAK do not activate BOK. A)** Mitochondria isolated BAX/BAK DKO MEFs were incubated with the indicated recombinant proteins for 30 min at 30°C. Samples are then centrifuged to separate released cyt c (S) from mitochondria-enclosed cyt c (P). **B)** GFP, GFP-BAK, GFP-BAX and GFP-BOK transfected BAX/BAK DKO MEF cells were incubated with cBID and samples are then centrifuged to separate released cyt c (S) from mitochondria-enclosed cyt c (P). **C)** GFP, GFP-BAK, GFP-BAX and GFP-BOK transfected BAX/BAK DKO MEF cells were incubated with BH3-only peptides and samples were then centrifuged to separate released cyt c (S) from mitochondria-enclosed cyt c (P).

### 3.3.4 DISCUSSION

Deciphering the molecular mechanisms by which BCL2 family members modulate MOMP is crucial to understand how these proteins dictate cell fate in health and disease. Multiple lines of evidence indicate that selected BH3-only proteins and mitochondrial lipids similarly trigger structural reorganization of BAX and BAK to achieve their functional activity at the MOM level (Czabotar *et al.*, 2014). However, protein:protein and protein:lipid interaction mechanisms regulating BOK function are practically unknown. Here, we have analyzed the ability of several major apoptosis-related mitochondrial lipids and BH3-only proteins to physically and functionally interact with a recombinant form of BOK (BOK $\Delta$ C6His) *in vitro*. Our study provides several new findings. First, we obtained strong evidence that BOK $\Delta$ C6His interacts with and inserts within model membranes enriched in the mitochondrion-specific lipid CL. Second, the BOK $\Delta$ C6His:CL interaction produces a conformational change in the protein and increases membrane permeability. Third, we failed to obtain any evidence indicating that BH3-only proteins can interact with and/or functionally activate BOK.

The interaction of BOK $\Delta$ C6His with CL was not unexpected based on previous observations with BAX/BAK and more recently with MCL1 (Kuwana *et al.*, 2002; Landeta *et al.*, 2011, 2014; Lucken-Ardjomande, 2008; Terrones *et al.*, 2004). However, the potential implication and exact role of CL in BAX-driven MOMP still remain controversial. Part of the debate originates from the fact that the majority of CL is localized to the MIM under non-apoptotic conditions (Osman *et al.*, 2011). However, it has long been recognized that in normal healthy mitochondria CL is enriched at mitochondrial contact sites that connect the MIM to the MOM, and it has also been reported that specific BCL2 family proteins, including BAX and BAK, can be locally concentrated at those CL-rich MOM domains (Schug & Gottlieb, 2009; Zhang & Saghatelian, 2013). It should also be taken into account that the BCL2-like folds of BCL2 proteins are primarily oriented towards the cytosol-facing leaflet of the MOM which is enriched in CL relative to the intermembrane-facing leaflet of the MOM, in accord with the asymmetrical interleaflet distribution of negatively charged lipids commonly found in biomembranes (Horvath & Daum, 2013). Moreover, recent studies revealed that the intramitochondrial distribution of CL is more dynamic than previously anticipated, particularly during apoptosis (Chu *et al.*, 2013; Crimi & Esposti, 2011; Heit *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2011).

What remains to be determined is the underlying cause of the preferential interaction of BOK $\Delta$ C6His with CL. Several possibilities exist that are not mutually exclusive. Since CL contains a di-phosphate group as the polar headgroup it is conceivable that BOK $\Delta$ C6His may display a positively-charged region in its surface allowing recognition of this structural feature of CL. In addition, since another unusual feature of CL is the highly unsaturated nature of its acyl chains, such structural characteristic could also be implicated in the propensity of BOK $\Delta$ C6His to interact with CL. It is also possible that CL favors the interaction of BOK $\Delta$ C6His with lipid membranes by producing specific changes in global lipid bilayer properties, rather than through a molecular-level recognition. In this regard, CL has the potential to alter membrane lipid lateral arrangement, membrane monolayer curvature, and membrane bending modulus, all of which can modulate protein:lipid interactions (Babahosseini *et al.*, 2012; García-Pacios *et al.*, 2009; Lewis & McElhaney, 2009). None of these possibilities can be discarded at this point, and all are worthy of further investigation. Of note, in a recent study, Chipuk *et al.* reported that BAK interacts specifically with S1P, which contradicts our lipid-dot blot results (Chipuk *et al.*, 2012).

We also showed that the interaction of recombinant BOK $\Delta$ C6His with CL-rich membranes produces a localized structural reorganization of the protein leading to oligomerization of BOK $\Delta$ C6His, and unleashing of a membrane-permeabilizing activity of the protein. The former

effect resembles the one we observed previously with BAK and with BAX (Landeta *et al.*, 2011; Kuwana *et al.*, 2000). However, further studies are required to determine whether the membrane topology adopted by BOK in CL-rich membranes is similar to that adopted by BAK or by BAX. Regarding the capacities of BOK $\Delta$ C6His to directly oligomerize in and to release small solutes from CL-rich liposomes, it is important to emphasize that both processes are dissimilar to the membrane activities described for BAX and BAK, as the latter two proteins neither oligomerize upon interaction with CL-rich membranes alone, nor breach their permeability barrier (Landeta *et al.*, 2011, 2014). In fact, multiple lines of evidence indicate that BAX and BAK must interact with a highly selected subset of BCL2 family proteins (the BH3-only proteins cBID, BIM and perhaps PUMA) to acquire the capacity for assembling into membrane-permeabilizing pores both in reconstituted systems and in the native MOM environment (Czabotar *et al.*, 2014). In contrast, we obtained no evidence so far supporting the notion that cBID/BIM/PUMA physically or functionally interact with BOK in model or native MOM membranes. However, considering that the BCL2 family comprises more than 20 members, the possibility remains that BOK activation and/or action may be modulated by other BCL2 –family members.

Based on these observations, we hypothesize that BOK causes apoptosis by perturbing the MOM structure through a membrane activity displaying some common features but also important differences with the membrane activities of BAX/BAK. Further studies on BOK activities and interaction-surfaces at the membrane level may open new pharmacological opportunities to modulate the physiological function of BOK for therapeutic benefit.

## 3.4 STUDYING BOK LOCALIZATION, FUNCTION AND INTERACTING PARTNERS IN THE CELLULAR ENVIRONMENT

### 3.4.1 INTRODUCTION

Proteins from the BCL2 family regulate apoptosis by modulating the permeability of the mitochondrial outer membrane (MOM). Depending on their function, BCL2 proteins can be divided in two main groups: the pro-apoptotic members and the anti-apoptotic members (Youle & Strasser, 2008). Initial characterization of BCL2 proteins identified a number of regions of sequence homology between them that were termed BCL2 homology (BH) motifs. The anti-apoptotic members including BCL-2, BCL-XL, BCL-W and MCL-1 all share four BH motifs. The pro-apoptotic proteins were divided into the BH3-only proteins such as BIM, BID, BAD, NOXA and PUMA, which contain only the BH3 motif; and the multi-domain effectors BAX, BAK and BOK that share BH1, 2 and 3 motifs. Nevertheless, the presence of *bona fide* BH1 and BH2 motifs in BOK has been recently put into question (Aouacheria *et al.*, 2013). Moreover, it has also been recently shown that the BOK gene is evolutionarily divergent from those of BAX and BAK (Aouacheria *et al.*, 2013).

It is well known that BAX and BAK exist as inactive monomers under normal conditions; during apoptosis, both proteins become functionally activate through a complex process culminating with their assembly into transmembrane oligomeric pores that breach the MOM permeability barrier to allow cyt c release. It is also increasingly recognized that the process of functional BAX/BAK activation is triggered by specific BH3-only proteins with the assistance of specific mitochondrial lipids. However, much more limited information exists concerning the mode of BOK activation and action. BOK was first identified in a yeast two-hybrid screen as a MCL-1-binding protein that behaved in a BAX-like, apoptogenic manner upon overexpression (Hsu *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1998). Subsequently, several groups confirmed and expanded the view that BOK is a proapoptotic factor akin to BAX/BAK (Bartholomeusz *et al.*, 2006; Echeverry *et al.*, 2013; Hsu & Hsueh, 1998; Hsu *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1998; Ke *et al.*, 2012). However, other studies revealed that BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> cells are highly resistant to diverse apoptotic stimuli even though they express detectable levels of endogenous BOK (Ke *et al.*, 2012). Furthermore, certain evidence suggests that overexpression of BOK in BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> cells neither induces cell death nor sensitizes the cells to apoptotic stimuli, suggesting that BOK-induced apoptosis is largely BAX/BAK dependent (Echeverry *et al.*, 2013).

Both BAX and BAK show ubiquitous tissue expression and have overlapping roles in the regulation of apoptosis during mammalian development and tissue homeostasis (Lindsten *et al.*, 2000). Mice lacking either BAX or BAK alone are largely normal (with the exception of *BAX*<sup>-/-</sup> males that are sterile), but the combined absence of BAX and BAK causes several phenotypic aberrations and only 10% of *BAX*<sup>-/-</sup> *BAK*<sup>-/-</sup> mice reaches adulthood (Lindsten *et al.*, 2000). In initial studies, BOK expression pattern appeared restricted to reproductive tissues (uterus and ovaries), and originated the name of the protein (BCL2 Ovarian Killer)(Hsu *et al.*, 1997). More recent work demonstrated that BOK is readily detectable in many additional organs such as the brain, spleen, lung and stomach (Ke *et al.*, 2012). Genomic ablation of BOK did not reveal major phenotypic abnormalities, indicating that its action may overlap that of other members of BCL2 family (Ke *et al.*, 2012). However, combined loss of BOK and BAK does not elicit any noticeable defects, and combined loss of BOK and BAX only increases the number of oocytes from different stages of development in old females, supporting the notion that BOK does not have a crucial pro-apoptotic function overlapping with BAX and BAK (Ke *et al.*, 2013). It remains to be determined, however, whether triple genetic ablation of BAX, BAK and BOK produces a more severe phenotype than that observed in BAX/BAK DKO mice.

Although structurally similar and redundant in function, BAX and BAK have different subcellular localizations. It has long been known that under healthy conditions, BAX resides mainly in the cytosol while BAK is primarily found at the MOM. Nevertheless, more recent studies indicate that the subcellular localization of BAX and BAK is more dynamic than previously anticipated, with BCL2-type anti-apoptotic members retrotranslocating BAX, and to a lesser degree BAK, from the MOM to the cytosol under healthy conditions (Todt *et al.*, 2013; Todt *et al.*, 2015). During apoptosis, retrotranslocation of both BAX and BAK diminishes leading to accumulation of the two proteins at the MOM. Interestingly, a very recent study showed that VDAC2 regulates mitochondrial localization of both BAX and BAK, and that BAK itself can also regulate BAX mitochondrial localization depending on the cellular physiological status (Ma *et al.*, 2014). In addition to being localized at the cytosol or/and at the MOM, different lines of evidence indicate that BAK and BAX can also localize to the ER and to the Golgi (Breckenridge *et al.*, 2003; Dumitru *et al.*, 2012; Hetz *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2009; Klee & Pimentel-Muiños, 2005; Nutt *et al.*, 2002; Oakes *et al.*, 2005; Oakes *et al.*, 2003; Scorrano *et al.*, 2003; Walensky, 2012; Wang *et al.*, 2011; Zong *et al.*, 2003). BAX and BAK can affect ER Ca<sup>+2</sup> stores and Ca<sup>+2</sup>-dependent death signals apparently by regulating type 1 inositol triphosphate receptors and thus Ca<sup>+2</sup> leak from the ER (Oakes *et al.*, 2005; Scorrano *et al.*, 2003; Zong *et al.*, 2003). The BOK protein, on the other hand, has also been localized to the mitochondria, ER, Golgi, and even to the nucleus (Bartholomeusz

*et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005; Yakovlev *et al.*, 2004). One recent study showed that a large fraction of BOK is directed towards ER, Golgi, and associated membranes of the secretory system (Echeverry *et al.*, 2013). At the ER, BOK may bind to type 1 inositol triphosphate receptors similarly to BAX and BAK, although this remains to be firmly established (Schulman *et al.*, 2013). It also remains to be determined whether other BCL2 family members and/or VDAC2 can regulate BOK mitochondrial localization as described for BAX and BAK.

BCL2-family proteins and mitochondrial dynamics have been linked for a long time (Beranek *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2007; Cuddeback *et al.*, 2001; Delivani *et al.*, 2006; Etxebarria *et al.*, 2009; Hoppins *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2014; Karbowski *et al.*, 2002; Karbowski *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Liu & Shio, 2008; Wasiaik *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2008). More than a decade ago, it was observed that during apoptosis the mitochondrial network undergoes fragmentation practically simultaneous with the BCL2-regulated MOMP event (Desagher & Martinou, 2000; Frank *et al.*, 2001). However, despite intense research effort, it still remains controversial whether mitochondrial fission is simply an epiphenomenon of apoptosis or whether it plays a more active role in the MOMP process. Supporting the latter possibility, it has been shown that the loss of DRP1 delays cyt c release and apoptosis (Brooks *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2001). To explain this phenomenon, two different but not necessarily excluding explanations have been put forward: (i) DRP1-induced perturbation of mitochondrial membrane structure directly favors MOMP (Youle & Karbowski, 2005), and/or (ii) DRP1 stimulates BAX oligomerization thereby indirectly favouring MOMP (Montessuit *et al.*, 2010). Interestingly, BAK has also been shown to regulate mitochondrial fragmentation during apoptosis by interacting with the mitochondrial fusion proteins, MFN1 and MFN2 (Brooks *et al.*, 2007). In addition, the anti-apoptotic protein BCL-XL reportedly interacts with DRP1 in neurons to modulate both mitochondrial fission and fusion, which in turn, impacts on cell viability (Berman *et al.*, 2009). Connected to the latter, it is noteworthy that the dual-function of some BCL2 family proteins appears to be conserved among different kingdoms since the *C. elegans* protein CED9 physically interacts with DRP1 to regulate mitochondrial fission or fusion depending on the cellular physiological status (Lu *et al.*, 2011). As for BOK, it has been shown that this protein causes fragmentation of Golgi and ER compartments under healthy conditions, and that BOK-deficient cells respond abnormally to the apoptosis-inducing drug brefeldin A which acts through the Golgi/ER (Echeverry *et al.*, 2013). However, the mechanism by which BOK affects Golgi/ER morphology remains to be elucidated. It is also unclear whether BOK-induced apoptosis is linked to mitochondrial morphological changes as observed for BAX and BAK.

In this chapter, we primarily investigated BOK localization, activities, and potential binding-partners at the cellular level. First, regarding BOK localization, we report that BOK localizes to both mitochondria and ER in several cell types. Interestingly, we found that mitochondria- but not ER-localized BOK becomes partially cytosolic in the absence of BAX and BAK. Secondly, regarding BOK's cellular activities, we showed that overexpression of BOK induces the mitochondrial pathway of apoptosis as potently as overexpression of BAX does. Of note, BOK induces apoptosis and cyt c release in both, BAX/BAK-proficient and BAX/BAK-lacking cells. In addition, we also show that BOK induces (i) mitochondrial fragmentation in a DRP1-independent manner, and (ii) that recombinant BOK $\Delta$ C6His triggers membrane lipid mixing, fusion, and fission in CL-rich liposomes. Finally, we performed GFP-BOK pull-down and mass spectrometry assays and identified several cellular BOK-interacting partners of potential interest that require further validation.

### 3.4.2 MATERIALS AND METHODS

**Materials-** Egg phosphatidylcholine (PC), egg phosphatidylethanolamine (PE), heart cardiolipin (CL), and egg phosphatidylglycerol (PG) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster,AL). KCl, NaCl, Tris Base, EDTA, lizozime, TCEP, DNase and ampicillin (Amp) were purchased from Sigma-Aldrich. Glycerol was purchased from VWR. Protease inhibitors were purchased from Roche. LB broth was purchased from Technovas. GST beads were purchased from Abtbeads. PreScission protease was purchased from GE Healthcare. GFP Trap for co-immunoprecipitation assay was purchased from chromotek. Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetalbovine serum and Penicylin-Streptomycin solution were purchased from Invitrogen. jetPRIME was purchased from Polyplus Transfection. Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I was purchased from BD Pharmingen (San Jose, CA).

**Cell lines-** Wildtype and SV40 transformed BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> double knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were kindly provided by Dr. I Marzo (University of Zaragoza, Spain). DRP1 knockout cells and CL knockout cells were kindly provided by Prof. Martinou (Université de Genève, Switzerland). Hela-BOK inducible stable cell lines were obtained in Prof. Martinou's lab (Université de Genève, Switzerland). This cell strains together with HeLa and HEK 293T cells were used.

**Generation of HA-BOK inducible cell lines-** To generate the lentiviruses first HEK 293T cells were transiently transfected with 5 units of either pCMV  $\delta$ R8.2, the plasmid encoding the structural component; 3 units of the lentiviral expression vector such as pF 5UAS or pFU GEV16 and 2 units of pVSV-G, the plasmid encoding the envelope. Cells were kept at 37°C and 24-48 hours post-transfection the medium was collected and filtered through a 0.8  $\mu$ m pores containing filter.



This medium contains the lentiviruses. Polybrene (1  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) was added to the filtered medium while shaking. Medium containing the lentiviruses was then added to MEF BAX/BAK DKO and HeLa cells. 24 hours after infection required selection antibiotics (puromycin or hygromycin) were added. None-infected cells were used as a selection control. Then, HEK 293T cells are transiently transfected as explained before, using the lentiviral expression vector encoding for our protein of interest. Then same steps are repeated until the selection is finished and our cells are ready to use.

**Cell culture and treatments-** All cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, U.S.A); supplemented with 10% fetalbovine serum (Invitrogen) and 1% Penicillin-Streptomycin solution (Invitrogen), in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C. In inducible stable cell lines HA-BOK expression was induced by adding 1 $\mu\text{M}$  4-OHT. Apoptosis was induced by adding 1 $\mu\text{M}$  staurosporine (STS).

**Transfection assay-** Transfections were performed using jetPRIME (Polyplus Transfection), according to the manufacturers' instructions.

**Subcellular fractionation assay-** Cells were firstly washed with ice cold PBS and then scrapped from the plate by using the following permeabilization buffer: 20 mM HEPES/KOH pH 7.5, 100 mM sucrose, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 0.025% digitonin and protease inhibitor cocktail. Next, samples were centrifuged at 13,000x g for 10 min thereby obtaining a supernatant fraction containing cytosolic proteins, and a pellet fraction containing permeabilized cellular fractions with intracellular organelles enclosed (semi-intact cells). Of note, we have previously determined that when MEF cells are permeabilized and centrifuged as described, the cytosolic marker GAPDH appears in the supernatant fraction while the mitochondrial marker cytochrome c appears in the pellet (unpublished results). Thus, this treatment allows for selective permeabilization of the cellular plasma membrane without permeabilizing the MOM and by extension the membrane of other intracellular organelles (i.e. semi-intact cells).

**Sodium carbonate treatment-** Pellet fractions containing semi-intact cells were resuspended in 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11.5 and incubated on ice during 20 min. Then, the pH was neutralized with 0.1 M HCl and incubated further for 5 min. Buffer A (400 mM Tris HCl, 100 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10m M  $\text{CaCl}_2$  and DNAase) was then added and samples were incubated for 10 min at 37°C. Samples were further centrifuged at 13,000x g for 10 min at 4°C, thereby separating a supernatant containing soluble proteins and proteins peripherally attached to the membrane, and pellet fraction containing integral membrane proteins. Resulting fractions were then analyzed by western blotting using an antibody against the protein of interest.

**Western blotting-** The protein extracts, were separated on a 10%-15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking with 5% non-fat milk for 1 h, the membranes were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C or at room temperature for 1h. After three washes, the membranes were incubated with secondary antibodies at the appropriate dilutions for 1 h at room temperature. Finally, detection was carried out using the chemiluminescent ECL-Plus Western blotting reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) and visualized on Hyperfilm™ ECL™ (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). Western blots were scanned and band quantification was performed with the ImageJ software.

**Immunofluorescence-** Cells were grown on coverslip slides, transfected with 1-2µg of the expression plasmids. After 18 hrs, mitochondria were labelled with mitotracker, incubating cells for 10 min at 37°C with mitotracker (50nM) (in the cases where mitotracker was used as mitochondrial marker dye). After replacing the medium by new one and incubating again for 10 minutes the cells were washed with phosphate buffered saline. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated for 20 min at room temperature. After washing cells 3 times with PBS, cells were permeabilized incubating them with cold acetone for 10 minutes at -20°C and washed again three times with PBS. Coverslips containing fixed and permeabilized cells were incubated for 45 min with 3% BSA in 0.1% Triton X-100 containing PBS (PBST). Cells were then incubated with the diluted antibody in 3% BSA in PBST in a humidified chamber for 1 h at room temperature or overnight at 4°C. The solution was then decanted and cells washed three times in PBST followed by incubation with the secondary antibody in 3% BSA-PBST for 1 h at room temperature in dark. Finally, secondary antibody was removed and cells were washed three times with PBST. Coverslips were mounted on the slides using a drop of mounting medium (fluorsave).

**Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum (ER) Colocalization assays-** Cells were cultured on coverslips and transfected using JetPRIME (Polyplus Transfection). Images were captured in an inverted confocal microscope (TE2000 U, Nikon, Melville, NY) equipped for epifluorescence and with a Nikon D-eclipse C1si confocal spectral detector, using an x60, 1.45 numerical aperture, oil immersion objective. The signal from each fluorophore was isolated by performing spectral unmixing with the EZ-C1 3.20 software (Nikon). Colocalization was quantified as the Pearson's coefficient using the JaCoP plug-in for ImageJ software (Bolte & Cordelières, 2006). For analysis, images were converted to 8-bit, cell perimeter was drawn manually, and the background was subtracted automatically.

**Mitochondrial Morphology Measurements-** Cells were cultured on cover glasses and transfected using JetPRIME (Polyplus Transfection). Images were captured as previously

described in an inverted confocal microscope (TE2000 U, Nikon, Melville, NY). Morphology was measured by counting 100 cells and calculating the percentage of cells containing mitochondria with abnormal morphology.

**Flow-cytometry assays-** PS exposure was measured using the Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, San Jose, CA). Cells were washed twice with cold Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) and resuspended in 100  $\mu$ l of 1X binding buffer. Annexin V-PE (5  $\mu$ l) was added and incubated in the dark for 15 min at room temperature. Then, 400  $\mu$ l of 1X binding buffer was added and analyzed on a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). A total of 100,000 events were analyzed. In assays with transfected cells, only GFP expressing cells were taken into account for analysis.

**Immunofluorescence for detecting cytoplasmic cytochrome c-** Cells were fixed as explained previously and incubated with anti-cytochrome c antibody. Cells were then visualized with an inverted confocal microscope (TE2000 U, Nikon, Melville, NY) equipped for epifluorescence and with a Nikon D-eclipse C1si confocal spectral detector, using an x60, 1.45 numerical aperture, oil immersion objective. The cytoplasmic cytochrome c was measured by counting 100 cells and calculating the percentage of cells transfected and with cytoplasmic cyt c.

**Statistical analysis-** Means and standard error (SE) were calculated statistically from three determinations. The data are expressed as mean  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed by using the two sample t-test (OriginPro 9.0) and all graphs were plotted using OriginPro 9.0 (OriginLab)  $p < 0.05$  was considered significant.

**Cryoelectron Microscopy (Cryo-EM)-** For the cryo-EM studies, proteins (25  $\mu$ M) were incubated with 1 mM LUVs 50 PC/20 PE/30 CL (mol/mol) for at least 15 min. Grids were prepared following standard procedures and observed at liquid nitrogen temperatures in a JEM-2200FS/CR transmission electron microscope (JEOL Europe, Croissy-sur-Seine, France) operated at 200 kV. An in-column omega energy filter helped to record images with improved signal to noise ratio by zero-loss filtering. The energy selecting slit width was set at 9 eV. Digital images were recorded on UltraScan4000CCDcam- era under low-dose conditions at a magnification of 55,058 obtaining a final pixel size of 2.7  $\text{\AA}$ /pixel.

**Transmission Electron Microscopy (TEM)-** Proteins (25  $\mu$ M) were incubated with 1 mM LUVs 50 PC/20 PE/30 CL (mol/mol) for at least 15 min. Aberration-corrected transmission electron microscopy (TEM) was performed using an PHILIPS CM120 Biofilter that contains an STEM module and electron energy loss spectroscopy (EELS) capabilities. This experiments were performed in the Microscopy Service from the UPV/EHU.

**DNA subcloning-**BOK, BAK and BAX cDNAs were subcloned in apEGFP-C2 vector, for expression in mammalian cells.

**DNA constructs for recombinant protein production-** Plasmid for expression of human BAK lacking the carboxyl-terminal 21 amino acids (BAK $\Delta$ C) was kindly provided by Dr. B Sot (Cambridge, UK). Plasmids for expression of human 6His-BCL-XL lacking the C-terminal 24 amino acids (BCL-XL $\Delta$ C) was a gift of Dr.Wang. cDNA of human BCL-XL $\Delta$ C-6His, was synthetically synthesized and cloned into pJexpress 434 vector by DNA2.0 (Menlo Park, CA; U.S.A). A 6-histidine tag plus a thrombin protease cleavage site was added at the C-terminus during gene synthesis. The cDNA of human BOK full-length (FL) was obtained from Origene and subcloned into a pGEX vector to express the protein in bacteria as a GST-tagged fusion protein. GST-BOKFL-6His was subjected to codon optimization by Genscript.

**Protein production-** Recombinant human BOK $\Delta$ C6His was expressed as C-terminal GST-tag fusion proteins and purified by affinity chromatography (Glutathion Sepharose beads, Abtbeads). Recombinant BAK $\Delta$ C21 was purified as previously described in Landeta *et al.* 2011. DRP1 was purified by affinity chromatography as explained in detail in the 3.1 chapter. Human BCL-XL $\Delta$ C-6His and human 6His-BCL-XL $\Delta$ C, were expressed as C-terminal 6His-tag fusion proteins and purified by affinity chromatography (Ni-NTA superflow, Qiagen). All proteins were purified from soluble fractions of bacterial extracts and were >90% pure as evaluated by Coomassie-stained SDS-PAGE. Proteins were aliquoted and stored at -80°C.

**Liposome Preparation-** Lipid mixtures at the indicated ratios were dissolved in chloroform/methanol (2:1), and organic solvents were removed by incubation under a vacuum for 2 h. Dry lipid films were resuspended in 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA (KHE buffer). Liposomes were then subjected to ten freeze/thaw cycles and subsequently extruded 10 times through two polycarbonate membranes of 0.2  $\mu$ m pore size (Nucleopore, San Diego, CA) to obtain large unilamellar vesicles (LUV).

**Fluorimetric Measurements of Intervesicular Lipid Mixing-** Membrane lipid mixing was monitored using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay described by Struck *et al.* (Struck *et al.*, 1981). The assay is based on the dilution of the NBD-PE/N- (lissamine rhodamine B sulfonyl)-PE FRET pair. LUV containing 2 mol% of each probe were mixed with unlabeled vesicles at a 1:10 ratio. Dilution of the fluorescent probes due to membrane fusion resulted in an increased NBD-PE fluorescence. The NBD emission was monitored at 530 nm with the excitation wavelength set at 465nm. A cutoff filter at 515nm was used between the sample and the emission monochromator to avoid scattering interferences. The fluorescence scale was calibrated such that the zero level corresponded to the initial residual fluorescence of the labelled vesicles and the 100% value corresponded to complete mixing of all the lipids in the

system. The latter value was set by the fluorescence intensity upon the addition of 10mM OG. Proteins were incubated with LUV (50  $\mu$ M) for 10 min in a thermostatically controlled 1-cm path length cuvette with constant stirring at 37 °C ( $V_{\text{final}}=750 \mu\text{l}$ ) followed by determination of extents of intervesicular lipid mixing.

**DLS Measurements-** Vesicle size was determined by DLS at a fixed angle of 90° and 37 °C using a Protein Solutions DynaPro instrument equipped with a temperature-controlled micro-chamber and a 64-channel correlator capable of estimating particle sizes in the range from 5 to 5000 nm. LUVs (50  $\mu$ M) were incubated with BOK $\Delta$ C6His in KHE buffer for 10 min at 37 °C under constant stirring using an Eppendorf Thermomixer followed by DLS analysis. Each measurement was done as an average of 20 data points and took approximately between 15 and 20 min. Data were analyzed by the cumulant method using the software provided by the instrument.

**Co-immunoprecipitation assay-** For one immunoprecipitation reaction the  $\sim 50 \times 10^6$  HEK 293T cells expressing a GFP-BOK protein were used. The assay was performed following the protocol provided in the GFP Trap Kit (chromotek). Briefly, cells were harvested and after being transferred to a pre-cooled tube, they were spined at 500x g for 3 min at 4°C and supernatant was discarded. After washing the cells twice with ice-cold PBS the cell pellet was resuspended in 200  $\mu$ l ice-cold lysis buffer (RIPA buffer without SDS, supplemented with protease inhibitors and 1mM PMSF). Then, cell lysate was centrifuged at 20.000x g for 10 min at 4°C and after transferring the lysate supernatant to a precooled tube 300  $\mu$ l dilution buffer was added (supplemented with protease inhibitors and 1mM PMSF). After equilibrating GFP-Trap beads in ice-cold dilution buffer diluted lysate was incubated with GFP-Trap beads 1h at room temperature in an orbital rotator. Then, it was centrifuged at 2.500x g for 2 min at 4°C and GFP-Trap beads were washed three times with ice-cold dilution buffer. Finally, GFP-Trap beads were resuspended in loading buffer and boiled for 10 min at 95°C to dissociate immunocomplexes from GFP-Trap. This sample was loaded onto an SDS-PAGE gel and analysed by mass spectrometry.

**Mass spectrometry-** Immunoprecipitated proteins were digested with trypsin following a standard in-solution digestion protocol (Stone & Williams, 1996). Liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS) spectra were acquired using a Q-TOF micro mass spectrometer (Waters, Milford, MA) interfaced with a CapLC System (Waters). Briefly, each sample was loaded onto a Symmetry 300 C18 NanoEase Trap precolumn (Waters) connected to a XBridge BEH130 C18, 75  $\mu$ m 150 mm, 3.5  $\mu$ m (Waters). Peptides were eluted with a 30 min linear gradient of 5–60% acetonitrile directly onto a NanoEase Emitter (Waters). Data-dependent MS/MS acquisitions were performed on precursors with charge states of 2, 3, or 4 over a survey m/z range of 400–1500. Obtained spectra were processed using default processing parameters by

VEMS and searched using MASCOT version 2.4.0. (Matrixscience, London, UK) against SwissProt Human database (version 2012\_07, 20232 sequences). For protein identification, the following parameters were adopted: carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, oxidation of methionines as variable modification, 100 ppm of peptide mass tolerance, 0.2 Da fragment mass tolerance, and one missed cleavage was allowed. The cutoff score used to filter peptide identifications was the Mascot identity score. This assay was performed in The Proteomics Unit of the UPV/EHU.

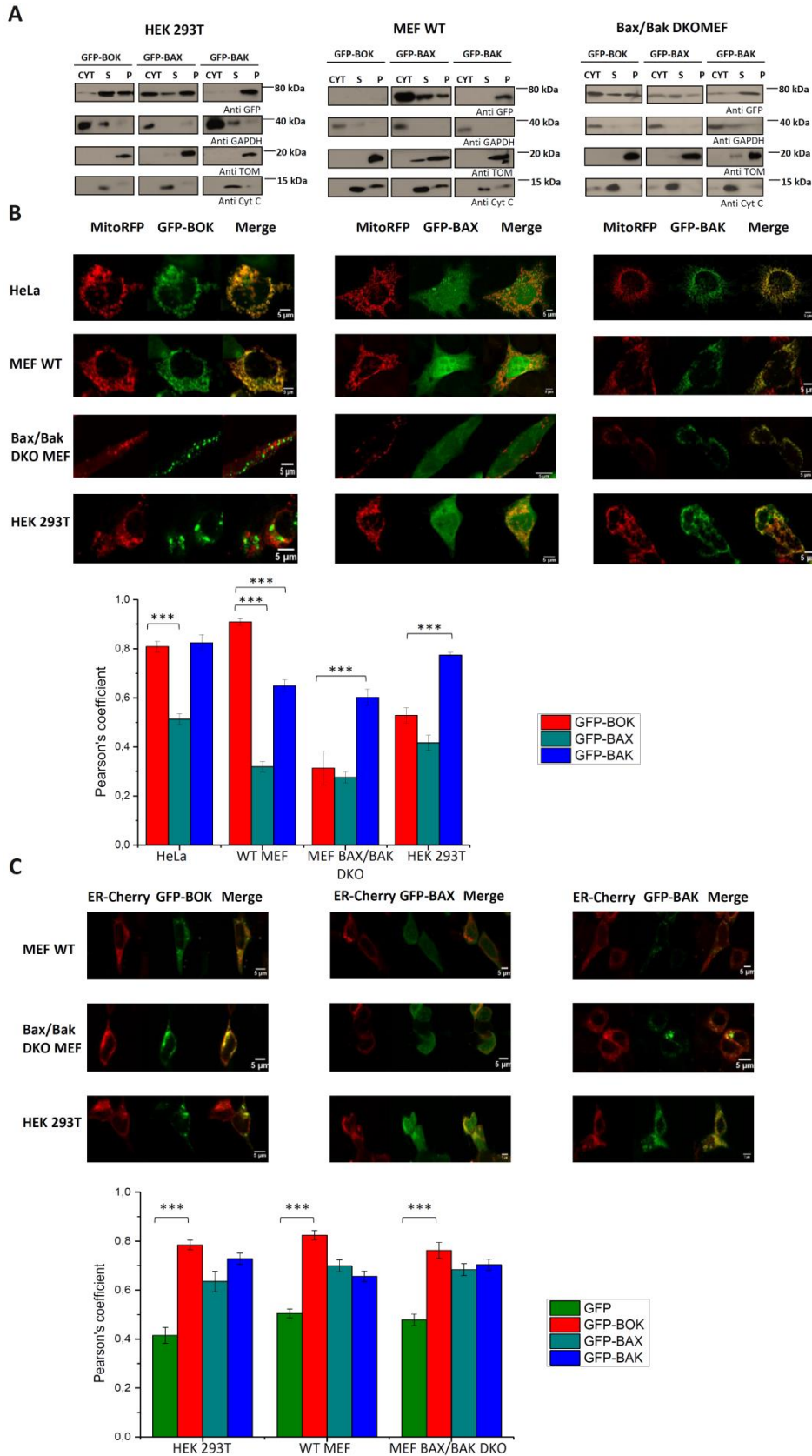
### 3.4.3 RESULTS

#### 3.4.3.1 BOK co-localizes partially with mitochondria

Different BCL2 family proteins differ in their subcellular localization and also depending on the nature and the physiological status of the cell. For example, in non-apoptotic conditions, BAX predominantly localizes to the cytosol (Hsu and Youle, 1998; Suzuki *et al.*, 2000), with only a small pool of the protein being loosely attached to the MOM, ER, and Golgi membranes (Edlich *et al.*, 2011; Schellenberg *et al.*, 2013; Zong *et al.*, 2003). Upon apoptosis induction, BAX dramatically accumulates at the MOM, and to a lesser extent at the ER. On the other hand, BAK is usually described as an integral membrane protein that predominantly localizes at the MOM and to a lesser degree at the ER, and whose intracellular localization does not change upon apoptosis stimulation. However, recent studies have shown that BAK can be also found in the cytosol of certain primary cells, with BAK shifting from the cytosol to the MOM during apoptosis, akin to BAX (Breckenridge *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 1999; Todt *et al.*, 2015; Zong *et al.*, 2003). For the case of BOK, different studies have identified this protein at distinct subcellular locations, ranging from the cytosol, to the mitochondria, ER, Golgi, and even the nucleus (Brown *et al.*, 2004; Echeverry *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2010; Yakovlev *et al.*, 2004).

Taking into account all the information described above, we decided to compare side-by-side the intracellular localization of BOK, BAX and BAK. For this purpose, we cloned BOK, BAK and BAX cDNAs in apEGFP-C2 vector. Next, GFP-tagged BOK, BAX and BAK were overexpressed in HEK 293T cells, followed by a crude subcellular fractionation assay described in Materials and Methods section. This analysis revealed that the vast majority of GFP-BOK was present at intracellular locations other than the cytosol (S and P fractions, Figure 1A). By contrast, the majority of GFP-BAX appeared in the cytosol (CYT fraction). To determine whether GFP-BOK was integrally inserted into the intracellular membranes, we treated the samples with sodium carbonate solution (Fujiki *et al.*, 1982). Peripheral membrane proteins are extracted from membranes by using alkaline carbonate ("S" fractions in Figure 1A), while integral membrane proteins are not ("P" fraction in Figure 1A). GFP-BOK displayed a mixed distribution according to

this assay, with the protein appearing both in the “S” fraction and in the “P” fraction. By contrast, all GFP-BAK appeared in the “P” fraction consistent with its membrane-integral nature described in most previous studies. Since it has been (Ke *et al.*, 2012) described that BAX and BAK can modulate each other’s mitochondrial localization, we next compared BOK intracellular localization in MEF WT and in MEF BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> (DKO) cells. As shown in Figure 1A, GFP-BAX and GFP-BAK intracellular distribution was very similar in MEF WT, in BAX/BAK DKO MEFs, and in HEK 293T cells. In the case of GFP-BOK, the level of protein expression was undetectable in MEF WT for some unknown reason. Nevertheless, in the case of MEF-DKO cells, a substantial fraction of GFP-BOK appeared in the cytosol-containing fraction. This result suggests that, GFP-BOK intracellular localization depends, at least in part, in the presence of BAX and BAK.



**Figure 1. BOK intracellular localization.** A) Assessment of GFP-BOK, GFP-BAX and GFP-BAK intracellular distribution by a crude subcellular fractionation assay. Cyt: Cytosolic fraction, S: Supernatant after sodium carbonate treatment (indicating peripheral membrane proteins) and P: pellet after sodium



carbonate treatment (indicating membrane-integrated proteins). **B and C)** Confocal microscopy images taken in GFP-BOK, GFP-BAX and GFP-BAK transfected HeLa, HEK 293T, WT MEF and BAX/BAK DKO MEF cells. Mitochondria were labeled with mitoRFP and ER with ER-cherry. Enlarged versions of these images can be found in the annex. Colocalization of proteins of interest with mitochondria and ER was assessed by Pearson's coefficient. Mean values  $\pm$ SEM are shown for three independent experiments with  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ .

To analyse further the subcellular distribution of GFP-tagged BAX, BAK, and BOK, we used confocal fluorescence microscopy. Specifically, HEK 293T, MEF WT, BAX/BAK DKO MEF, and HeLa cells were co-transfected with GFP-BOK, GFP-BAX and GFP-BAK fusion proteins together with the mitochondrion-specific fluorescent marker mito-RFP, and fixed cells were examined under the fluorescence microscope 18 hours post-transfection. In agreement with results obtained in cellular sub-fractionation assays, GFP-BAK predominantly co-localized with the mitochondrial marker in all cell types examined, while GFP-BAX displayed a cytosolic distribution in all cases examined (Figure 1B, see also annex). Also as expected from results obtained from cellular subfractionation experiments, GFP-BOK presented a non-cytosolic distribution, with the protein co-localizing almost exclusively with mito-RFP in HeLa and MEF WT cells. Surprisingly, BOK only localized partially with mito-RFP in HEK 293T cells, and apparently even less in BAX/BAK DKO MEFs. Moreover, many BAX/BAK DKO MEF cells overexpressing GFP-BOK showed large proteinaceous aggregates that were not localized to mitochondria. Interestingly, Edlich *et al.* (Edlich *et al.*, 2011) observed similar protein aggregates upon overexpressing GFP-BAX in HCT116 BAX/BAK DKO cells and induction of apoptosis with actinomycin D (Edlich *et al.*, 2011). Further analysis using Pearson's correlation coefficients (Rr) showed that GFP-BOK localized to mitochondria (i) predominantly, in HeLa and MEF WT cells ( $Rr = 0.8 \pm 0.02$  and  $0.9 \pm 0.013$ ), (ii) partially, in HEK 293T cells ( $Rr = 0.53 \pm 0.03$ ), and (iii) to a minor extent, in BAX/BAK DKO MEFs ( $Rr = 0.31 \pm 0.06$ ) (Figure 1B).

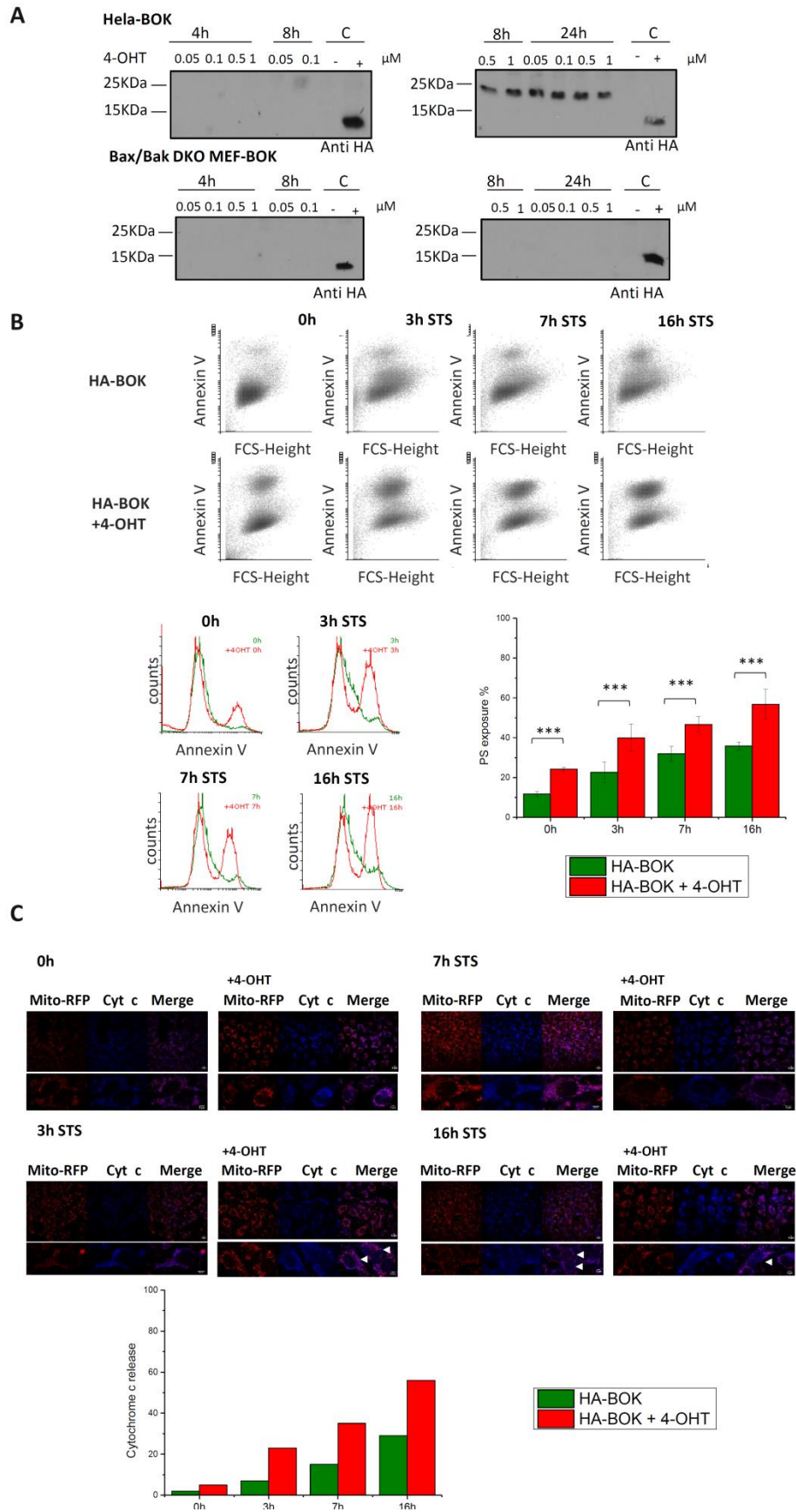
We next examined co-localization of GFP-tagged BOK, BAX and BAK with an ER-specific fluorescent marker (ER Cherry). As shown in Figure 1C (and annex), GFP-BOK, GFP-BAX and GFP BAK, all three substantially co-localized with ER-Cherry in MEF WT, BAX/BAK DKO MEF and HEK 293T cells. Furthermore, Pearson correlation analysis indicates that the amount of GFP-BOK associated to ER was similar in MEF-WT and in BAX/BAK DKO MEFs suggesting that BAX and/or BAK do not modulate ER localization of BOK. Nevertheless, a potential caveat of this analysis is that GFP displayed a high degree of colocalization with ER-Cherry (0.4-0.5 values), despite it is well established that GFP is a cytosolic (non-ER resident) protein.

Taken together, our microscopic and biochemical studies indicate that GFP-BOK is not a cytosolic protein as GFP-BAX; rather GFP-BOK localizes to and is partially inserted into the membranes of mitochondria and the ER. We also present evidence indicating that GFP-BOK associates with

mitochondria in a cell-dependent manner that depends, at least in part, in the presence of BAX and BAK.

### **3.4.3.2 BOK induces apoptotic cell death in the presence and absence of BAX/BAK**

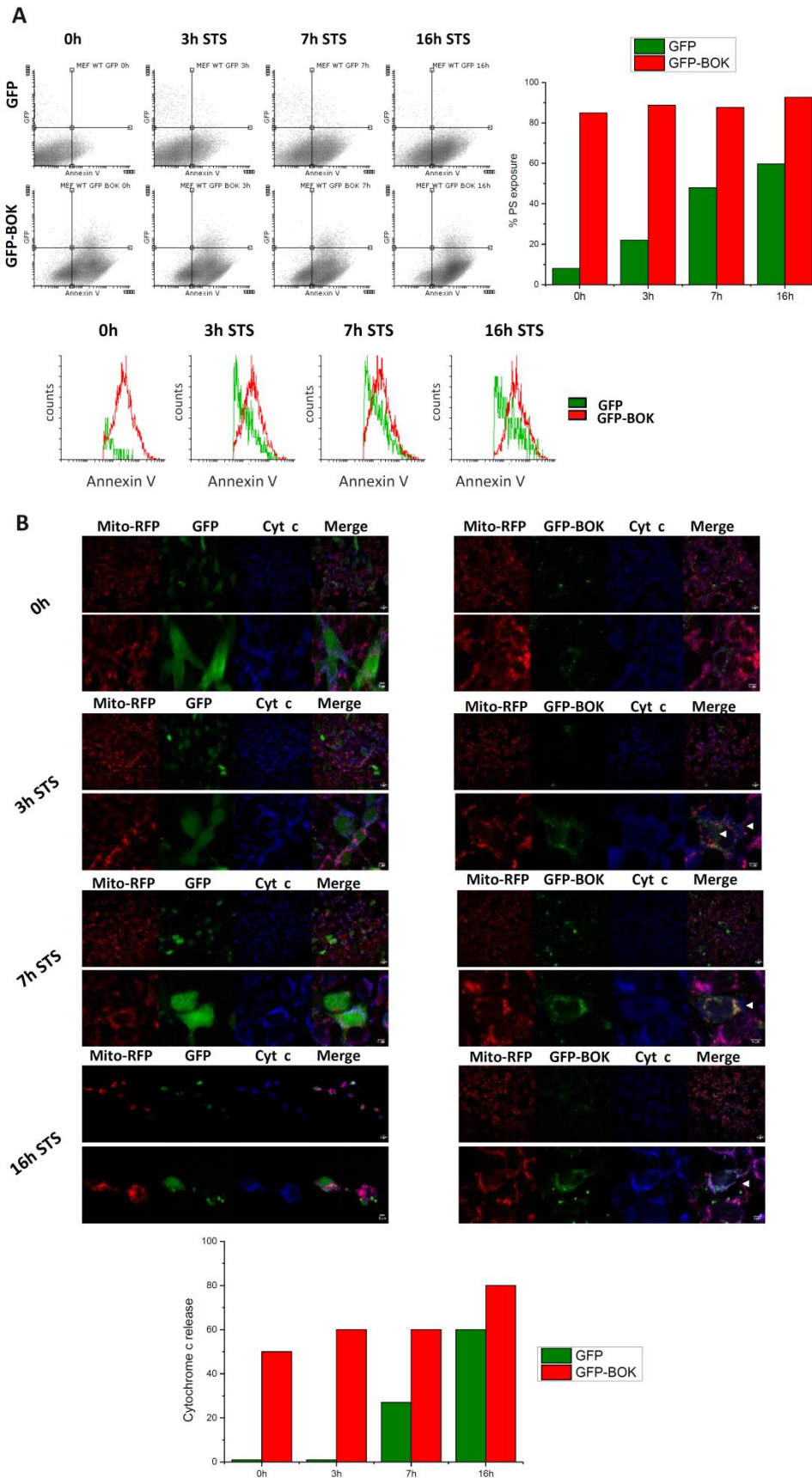
Transient transfection often leads to unphysiologically high expression levels of the protein of interest that can artefactually affect cellular viability. Thus, to assess the impact of BOK on cell viability, we attempted to obtain inducible cell lines allowing for regulated expression of HA-tagged BOK under the control of 4-OHT. Indeed, as shown in Figure 2A, robust HA-BOK expression could be detected in HeLa cells at 24 h post-treatment with 0.5  $\mu$ M 4-OHT, while for some unknown reasons HA-BOK could not be expressed in BAX/BAK DKO MEF cells under the same experimental conditions. Next, inducible HeLa cells were treated with 1 $\mu$ M 4-OHT for 24 hours followed by addition of staurosporine (STS) and further incubation of the cells for 3h, 7h and 16h. As shown in Figure 2B and 2C, the mere induction of BOK expression led to small but significant increases in PS exposure and in mitochondrial cytc release (samples designated as “HA-BOK, 0h” in Figure 2B, 2C). Furthermore, overexpression of HA-BOK sensitized HeLa cells to STS induced PS exposure and cyt c release(Figures 2B, 2C and annex).



**Figure 2. Induction of HA-BOK expression provokes cell death.** A) HA-BOK protein expression in inducible HeLa and BAX/BAK DKO MEF cells, with different 4-OHT concentrations and at different times

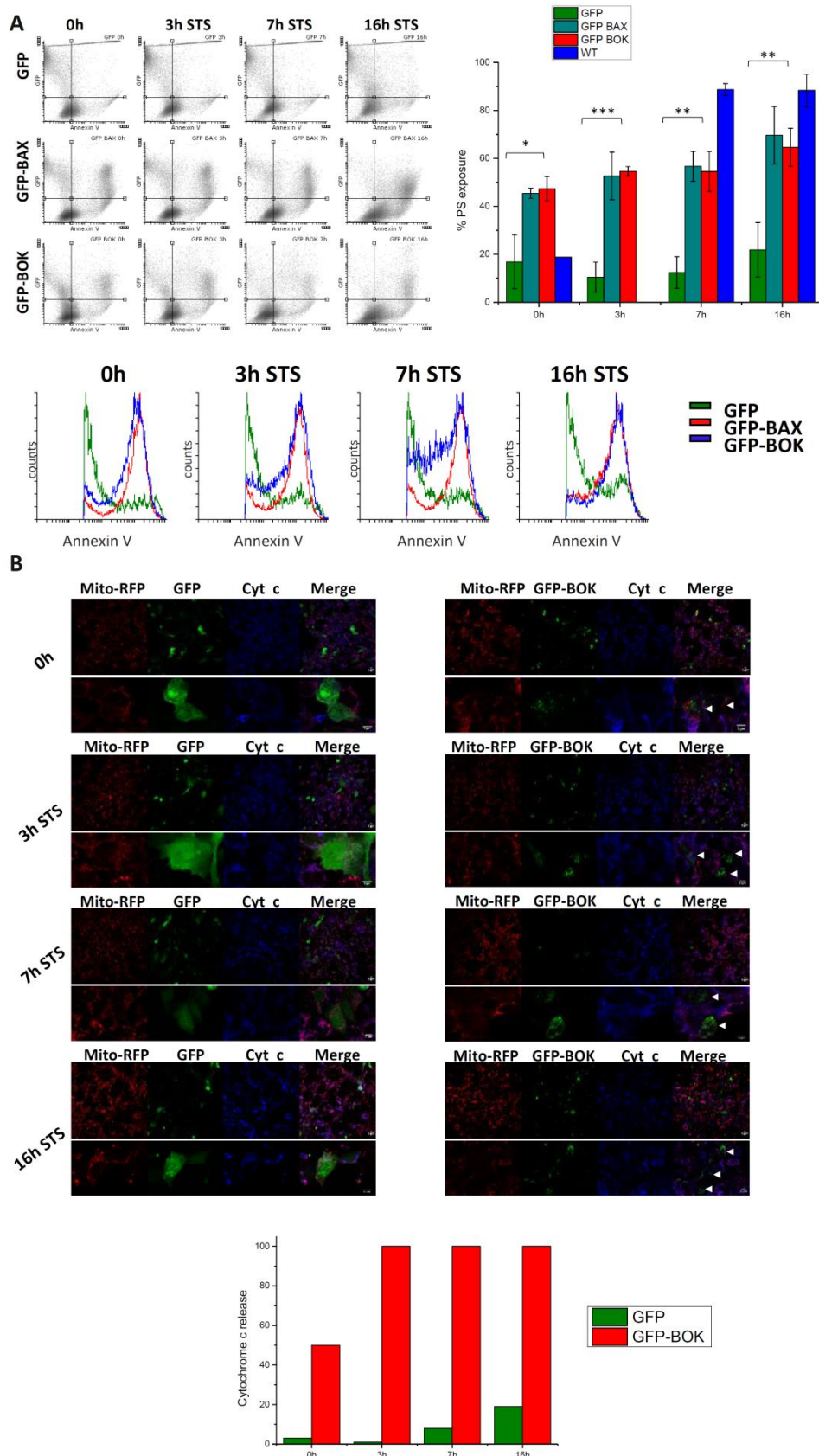
of 4-OHT exposure. This panel depicts a western blot representative of two independent experiments. **B)** PS exposure induced by HA-BOK expression in inducible HeLa cells assessed by Annexin V kit by FACS. 0h indicates that these cells have not been treated with STS, 3h, 7h and 16h indicate that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. Raw data are shown in the top, bottom left figure shows histogram representation of Annexin V. And bottom right graph represents data from 3 independent experiments. **C)** Cytochrome c release induced by expression of HA-BOK in inducible HeLa cells, assessed by immunostaining and confocal microscopy. Arrowheads indicate cells with cytosolic cytochrome c. Images shown represent a single experiment. Images of larger sizes can be found in the annex.

We next decided to investigate whether BOK-induced apoptosis was dependent on BAX and BAK. As shown in Figure 3, overexpression of GFP alone by transient transfection did not led to substantial PS exposure or mitochondrial cyt c release in MEF WT cells (samples designated as “GFP, 0h” in Figure 3A, 3B and annex). However, overexpression of GFP-BOK by transient transfection in MEF WT cells led to a dramatic increase in the level of PS exposure and cyt c release (samples designated as “GFP-BOK, 0h” in Figure 3A and 3B). Moreover, GFP-BOK overexpression stimulated mitochondrial cyt c release induced by STS treatment (samples designated as “GFP-BOK, 3h, 7h, and 16h” in Figure 3B and annex). Importantly, the mere overexpression of GFP-BOK in BAX/BAK DKO MEFs also induced substantial PS exposure and cyt c release (samples designated as “GFP-BOK, 0h” in Figure 4A, 4B and annex), while GFP alone did not. Moreover, treatment of BAX/BAK DKO MEF cells overexpressing GFP-BOK with STS produced further increase in the level of PS exposure and mitochondrial cyt c release.



**Figure 3. GFP-BOK overexpression induces cell death in WT MEF cells. A)** PS exposure assessed with Annexin V kit by FACS in GFP and GFP-BOK transfected WT MEF cells. 0h indicates that these cells have

not been treated with STS, 3h, 7h and 16h indicate that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. Raw data are shown in the top left side. Bottom shows histogram representation of Annexin V. Top right graph represents data from 2 independent experiments. **B)** Cytochrome c release assessed by immunostaining and confocal microscopy in GFP and GFP-BOK transfected WT MEF cells. Arrowheads indicate cells with cytosolic cytochrome c. This figure represents a single experiment, and it can be found at larger size in the Annex.



**Figure 4. GFP-BOK overexpression induces cell death in BAX/BAK DKO MEF cells. A)** PS exposure assessed with Annexin V kit by FACS in GFP, GFP-BAX and GFP-BOK transfected BAX/BAK DKO MEF cells.

PS exposure of untransfected WT MEF cells is measured as positive control. 0h indicates that these cells have not been treated with STS, 3h, 7h and 16h indicate that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. Raw data are shown in the top at the left side, bottom figure shows histogram representation of Annexin V in transfected cells. And top right graph represents data from 3 independent experiments. **B)** Cytochrome c release assessed by immunostaining and confocal microscopy in GFP and GFP-BOK transfected BAX/BAK DKO MEF cells. Arrowheads indicate cells with cytosolic cytochrome c. This figure represents a single experiment, and it can be found in the annex with a bigger size.

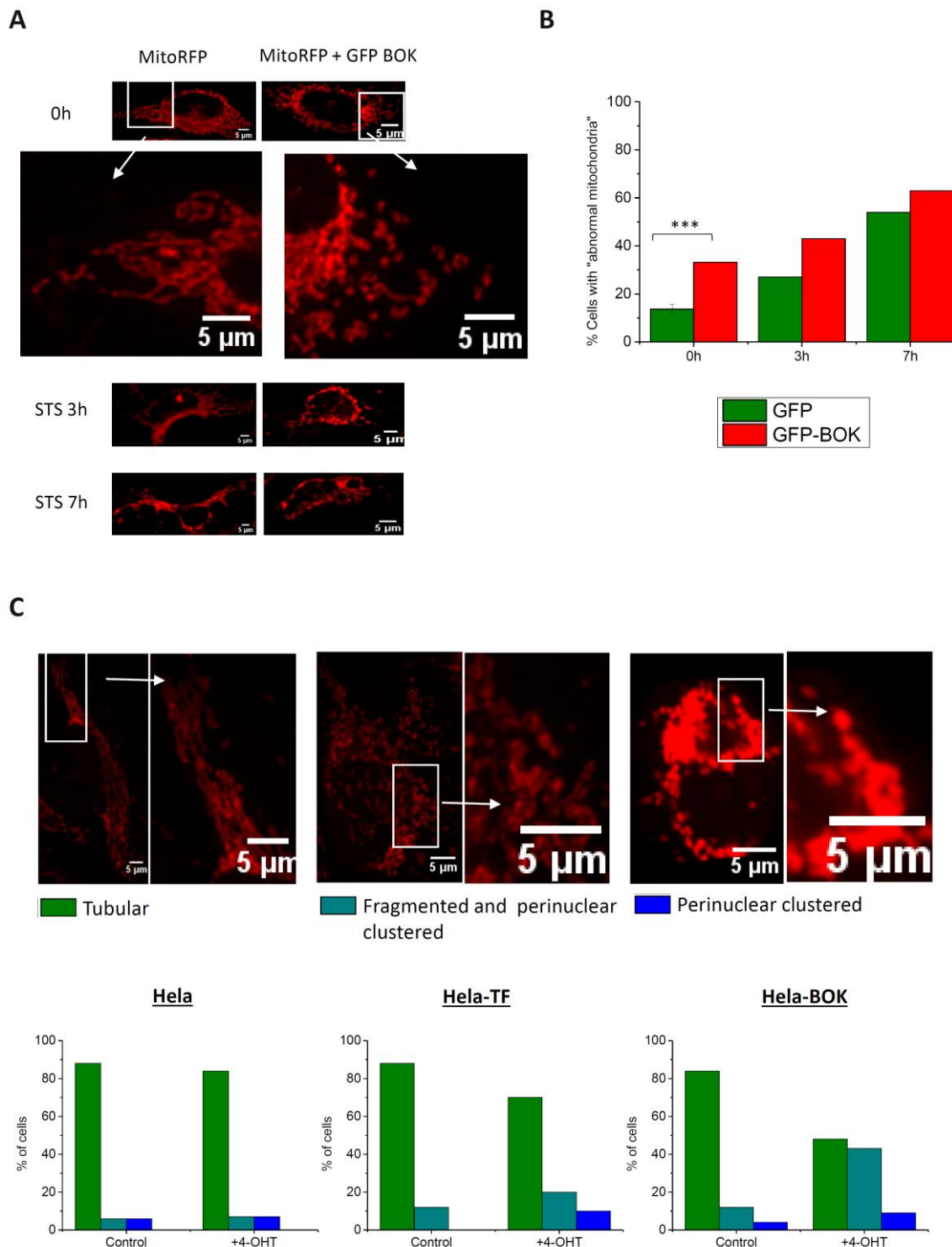
Overall, these data indicate that BOK overexpression triggers the mitochondrial apoptotic pathway both in the presence and in the absence of BAX and BAK.

### **3.4.3.3 BOK induces changes in mitochondrial morphology**

We next wished to examine whether BOK expression may affect mitochondrial morphology, as previously observed with other BCL2 family members including BAX and BAK.

Overexpression of GFP-BOK in HeLa cells changed the overall appearance of the cellular mitochondrial network (Figure 5A). Compared to GFP transfected cells which displayed a continuous mitochondrial network homogeneously distributed through the cytosol, GFP-BOK transfected cells showed mitochondria mainly clustered around the nucleus showing fragmented mitochondria in the periphery (Figure 5B). A similar effect was also observed when HA-BOK was expressed in inducible HeLa cells (Figure 5C). In this case, we could distinguish three different mitochondrial morphologies: tubular, fragmented and perinuclearly clustered. More specifically, untreated HeLa cells and HeLa cells containing the transcription factor (HeLa-TF) displayed a predominantly tubular mitochondrial network that remained unaltered upon 4-OHT addition. In the case of HeLa cells inducible for BOK expression (HeLa-BOK), in the absence of HA-BOK expression, the predominant mitochondrial morphology for the majority of the cells examined was also a tubular mitochondrial network. However, upon 4-OHT treatment the percentage of tubular mitochondria decreased to about half of total cells examined, while practically the other half of the cells showed perinuclear mitochondrial clustering with visible fragmented organelles localized in the periphery (Figure 5C).

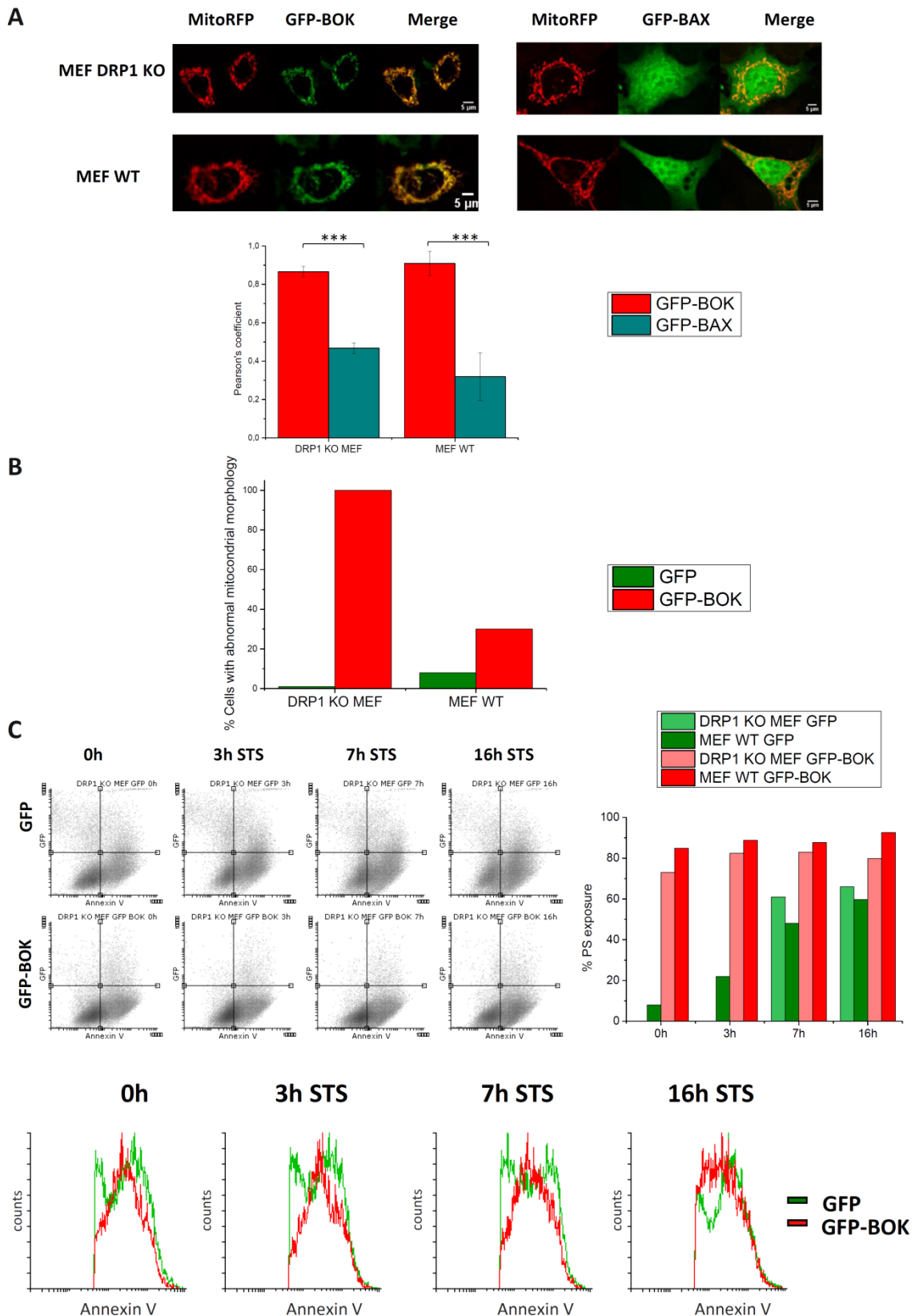




**Figure 5. GFP-BOK induce changes in mitochondrial morphology. A)** GFP-BOK transfection in HeLa cells induces changes in mitochondrial morphology: compared to GFP transfected cells which have a continuous mitochondrial network homogeneously distributed through the cytosol, GFP-BOK transfected cells show perinuclear clustering of mitochondria with fragmented mitochondria in the periphery. 0h indicates that these cells have not been treated with STS, 3h and 7h indicate that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. White squares indicate the regions that have been zoomed. Scale bars represent 5μm. **B)** Graphical representation of percentage of cells containing

abnormal mitochondria (perinuclear clustered mitochondria + fragmented mitochondria in the periphery). 0h is representative of 2 independent experiments, 3h and 7h are representative of a single experiment. **C**) Images of three different cells representing the three different mitochondrial network morphologies (tubular, fragmented and perinuclear clustered, and perinuclear clustered) observed upon HA-BOK expression induction. White squares indicate the regions that have been zoomed. Scale bars represent 5 $\mu$ m. HA-BOK expression in inducible HeLa cells induces changes in mitochondrial morphology, while HeLa cells and HeLa cells with transcription factor (HeLa-TF) have a normal mitochondrial network upon 4-OHT exposure. HA-BOK expressing cells show perinuclear clustering of mitochondria with fragmented mitochondria in the periphery. Graphical representation of percentage of cells containing each one of these three different mitochondrial morphologies.

Previous studies showed that DRP1 is implicated in apoptotic mitochondrial morphology changes and in BAX-induced apoptosis. Thus, we next examined whether genetic deletion of DRP1 affects BOK intracellular distribution, BOK-induced mitochondrial morphology changes, and BOK-induced apoptosis. GFP-BOK localization did not differ significantly in DRP1 KO MEFs relative to WT MEFs, as observed for the case of GFP-BAX (Figure 6A). Remarkably, the amount of cells showing abnormal mitochondrial morphology did not decrease, but actually increased in DRP1 lacking cells relative to WT MEFs (Figure 6B). Interestingly, GFP-BOK overexpression induced similar %PS exposure in MEF-WT and MEF DRP1<sup>-/-</sup> cells (Figure 6C). Together these data indicate that GFP-BOK overexpression alters normal mitochondrial morphology in a DRP1-independent manner, and also suggest that this process *per se* may not be directly linked to the pro-apoptotic activity of GFP-BOK.



**Figure 6. BOK localizes to mitochondria, induces mitochondrial morphology changes, and triggers apoptosis independently of DRP1. A)** GFP-BOK localization is not altered in DRP1 KO MEF cells, compared to WT MEF cells. 0h indicates that these cells have not been treated with STS, 3h, 7h and 16h indicate

that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. Scale bars represent 5 $\mu$ m. Mito-RFP and GFP/GFP-BOK colocalization is represented by Pearson's coefficient in the graph. **B)** Mitochondrial morphology changes driven by GFP-BOK overexpression in WT and DRP1 KO cells. **C)** PS exposure assessed with Annexin V kit by FACS in GFP and GFP-BOK transfected DRP1 KO MEF and WT MEF cells. 0h indicates that these cells have not been treated with STS, 3h, 7h and 16h indicate that these cells have been treated with STS and analyzed after the time represented. Raw data are shown in the top at the left side, bottom figure shows histogram representation of Annexin V in transfected cells. And top right graph represents data from a single experiment.

#### **3.4.3.4 BOK can induce remodelling of CL containing membranes *in vitro***

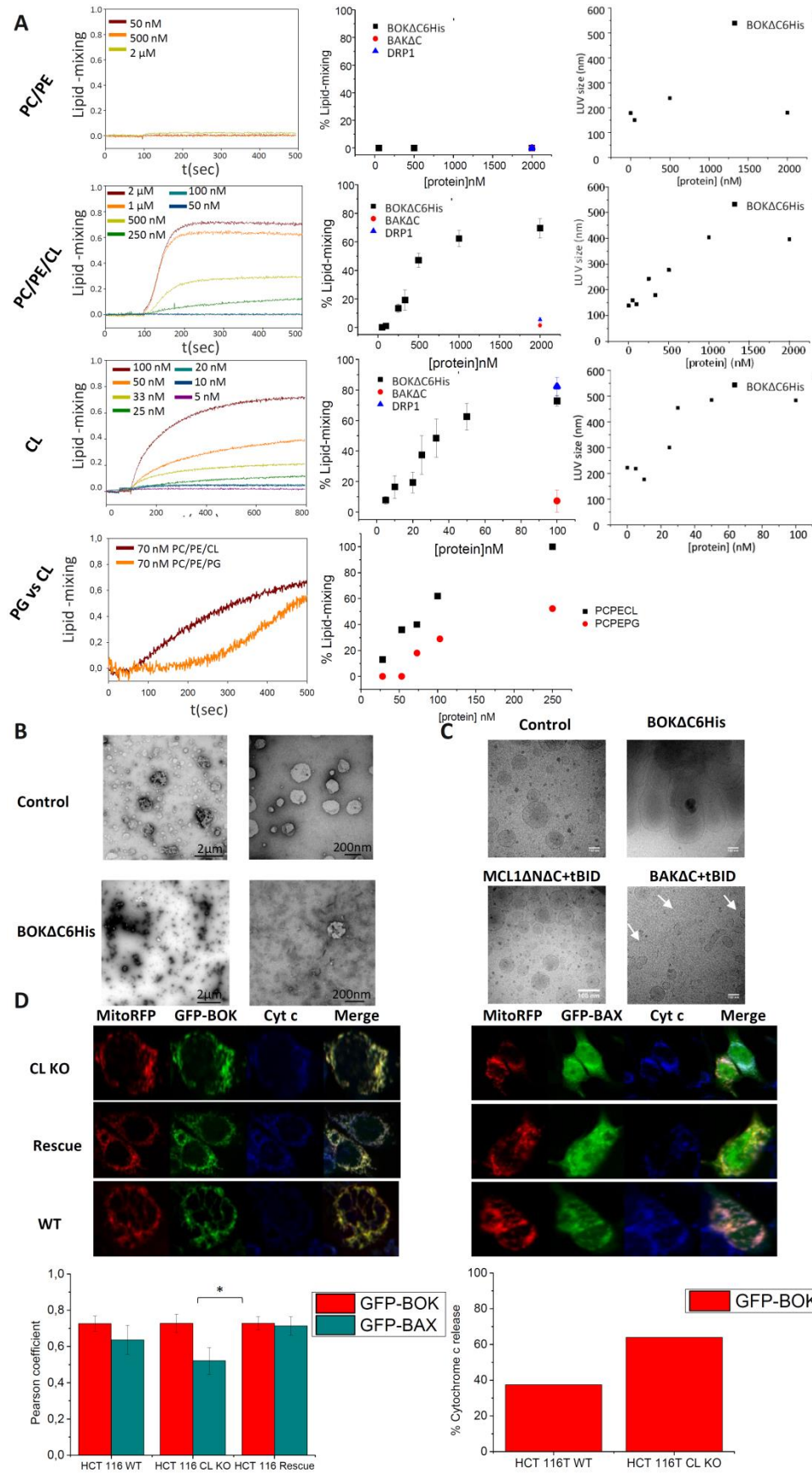
Mitochondrial morphological changes involve remodelling of mitochondrial membranes through membrane fusion and/or fission processes. Therefore, we decided to study the capability of BOK to induce membrane remodelling *in vitro*, using recombinant BOK $\Delta$ C6His protein and membrane model systems. To this aim, we used a membrane lipid mixing assay based on fluorescence resonance energy transfer from 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl) (NBD-PE) to 1,2-dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissaminerhodamine B sulfonyl) (Rho-PE) (Struck *et al.*, 1981). Large unilamellar vesicles (LUVs) containing desired lipid composition were prepared with or without addition of NBD-PE and Rho-PE. When the two dyes are present at an appropriate concentration in the same liposome, the fluorescence of NBD is quenched by rhodamine due to FRET. Upon fusion of these LUVs with unlabelled LUVs, the distance between the two dyes increases, resulting in a dequenching of NBD fluorescence.

As shown in Figure 7A, BOK $\Delta$ C6His induced dose-dependent and saturable membrane lipid mixing in 50 PC/20 PE/30 CL (mol%) and in 100%CL LUVs. By contrast, BOK $\Delta$ C6His did not induce noticeable increase in NBD fluorescence in CL-devoid LUVs, consistent with the inability of the protein to bind to these type of vesicles (see Chapter 3). Interestingly, the membrane lipid-mixing activity of BOK $\Delta$ C6His appeared specific, since neither BAX nor BAK $\Delta$ C induce significant membrane lipid-mixing in CL-containing LUVs (Figure 7A). Analysis of vesicle size distribution by quasy-elastic light scattering showed that BOK $\Delta$ C6His treatment increases the mean size of liposomal particles, indicating the protein elicits vesicle clustering and/or liposome fusion.

Additional experiments showed that replacing CL with PG, while maintaining the net charge of the vesicles, diminishes but does not abolish the lipid mixing activity of BOK $\Delta$ C6His (Figure 7A). To gain further insight into the effect exerted by BOK $\Delta$ C6His on CL-containing membranes we used transmission electron microscopy (TEM) and cryo-electron microscopy (cryo-EM).

Treatment of CL-rich LUV with BOK $\Delta$ C6His lead to liposome fragmentation as visualized by TEM (Figure 7B), and to liposome fusion as visualized by cryoTEM (Figure 7C). No further changes were observed by co-addition of cBID. By contrast, treatment of CL-rich vesicles with BAK $\Delta$ C+cBID produced large “holes” in the liposomal membranes, while the MCL1 $\Delta$ C+cBID mixture did not produce any noticeable effect (Figure 7C).

Collectively, the results described above demonstrate that BOK $\Delta$ C6His possesses an intrinsic capacity to remodel CL-containing membranes. Based on these observations made *in vitro*, we next assessed the role of CL in BOK cellular activity using CL synthase KO HCT 116 cells. We found that GFP-BOK similarly localized to mitochondria in WT, CL KO, and rescued HCT 116 cells (Figure 7D). Moreover, GFP-BOK preserved the ability to induce cyt c release in CL KO cells (Figure 7D). Together these results suggest that CL is not required for GFP-BOK mitochondrial localization or for apoptosis induction by GFP-BOK. However, it is worth mentioning here that CL KO cells display a 4-fold increase in PG levels. Since BOK $\Delta$ C6His binds to PG and induces lipid mixing in PG-containing liposomes, it appears reasonable to argue that PG accumulated in CL KO cells may act as a substitute for CL to allow BOK mitochondrial localization and BOK-induced apoptosis triggering.



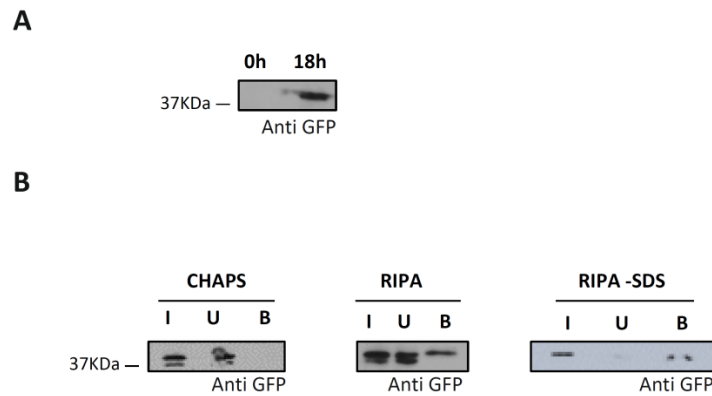
**Figure 7. BOK induces remodelling of CL-containing membranes *in vitro*.** A) Lipid mixing and DLS experiment results. Left: Lipid-mixing kinetics of BOKΔC6His at different concentrations and with LUVs of

different lipid compositions. Middle: Results of lipid-mixing of BOK $\Delta$ C6His, BAK $\Delta$ C and DRP1, representative of three independent experiments. Right: DLS results for BOK $\Delta$ C6His. **B)** TEM of 50 PC/20 PE/30 CL (mol%) LUVs (1mM) alone or in the presence of recombinant BOK (25 $\mu$ M). **C)** Cryo-EM images of 50 PC/20 PE/30 CL (mol%) LUVs (1mM) alone or in presence of BAK $\Delta$ C and tBID; MCL1 or BOK $\Delta$ C-6His (25 $\mu$ M). **D)** Confocal microscopy images of GFP-BOK and GFP-BAX overexpressing WT, CL KO and rescue HCT116 cells, showing GFP-BOK and GFP-BAX localization and overexpression driven cytochrome c release.

### 3.4.3.5 Searching for BOK-interacting partners

Since BOK did not interact with any BH3-only proteins, we decided to search for additional BOK-interacting cellular partners. For this aim, HEK 293T cells were transfected with GFP-BOK, followed by co-immunoprecipitation (co-IP) of the protein using the GFP-Trap kit (chromotek). First, we assessed GFP-BOK protein expression by western blotting (Figure 8A). Then, we selected a suitable cell lysis solution. Detergents can promote conformational changes in BCL2 family proteins (Feng *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 1997), but it appears that CHAPS induces relatively minor structural changes in these proteins (Antonsson *et al.*, 2000; Hsu & Youle, 1998). Thus, we first used CHAPS-containing solution to perform the co-IP assay (Figure 8B). Unfortunately, under these conditions, no detectable GFP-BOK was obtained in the B fraction. We next repeated the co-IP assay using harsher RIPA lysis solution leading to efficient GFP-BOK immunoprecipitation. However, as RIPA buffer contains the harsh denaturing ionic detergent SDS, we decided to repeat the co-IP with SDS-lacking RIPA buffer. As shown in Figure 8B, most GFP-BOK was also co-immunoprecipitated using RIPA-SDS lysis solution.

Once the appropriate lysis solution had been identified, co-IP samples were obtained run on SDS-PAGE gels, and proteins were extracted from the gel and trypsinized prior to mass spectrometry (LC/MS-MS) analyses. The co-IP assay was performed three times and proteins that were found at least twice in the GFP-BOK co-IP sample but were absent in the controls (cellular samples co-IP but without GFP-BOK expression) were considered as positive results. What follows is a list of all positive proteins identified in this set of experiments, which had been classified attending to their intracellular localization (Table 1).



**Figure 8.** **A)** GFP-BOK expression in transfected HEK 293T cells. **B)** Western blot of GFP-BOK co-immunoprecipitation steps in presence of different detergents. I:Input, U:Unbound and B:Bound.

**Table 1. Summary of the GFP-BOK interacting proteins classified by their intracellular localization.** We have highlighted in blue the most interesting proteins among all the proteins that were identified as “positive” attending to their capacity to co-immunoprecipitation with GFP-BOK.

### MITOCHONDRIA

Accession	Name	Localization	Function
O00411	DNA-directed RNA polymerase.		
O43169	Cytochrome b5 type B.	MOM	Electron carrier for several membrane bound oxygenases.
P23786	Carnitine O-palmitoyltransferase 2	MIM	Lipid metabolism, Beta oxidation.
P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase		Catalytic activity: sn-glycerol 3-phosphate + a quinone = glycerone phosphate + a quinol.
P49753	Acyl-coenzyme A thioesterase 2		Catalyzes the hydrolysis of acyl-CoAs to the free fatty acid and coenzyme A (CoASH), providing the potential to regulate intracellular levels of acyl-CoAs, free fatty acids and CoASH. Displays high levels of activity on medium- and long chain acyl CoAs.
P51398	28S ribosomal protein S29		Involved in mediating interferon-gamma-induced cell death.
P51398-2	Isoform 2 of 28S ribosomal protein S29		
P51398-3	Isoform 3 of 28S ribosomal protein S29		
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	Mitochondrial membrane	Converts sorbitol to fructose. May play a role in the sperm motility by providing an energetic source for sperm.
Q13057	Bifunctional coenzyme A synthase	Matrix +Cytoplasm	



Q13057-2	Isoform 2 of Bifunctional coenzyme A		Bifunctional enzyme that catalyzes the fourth and fifth sequential steps of CoA biosynthetic pathway
Q16611	Bcl-2 homologous antagonist/killer	MOM	Proapoptotic.
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]		Catalyzes the conversion of oxaloacetate (OAA) to phosphoenolpyruvate (PEP).
Q16822-2	Isoform 2 of Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]		
Q3SY69	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase		Catalytic activity: 10-formyltetrahydrofolate + NADP+ + H2O = tetrahydrofolate + CO2 + NADPH
Q3SY69-3	Isoform 3 of Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase		
Q53H12	Acylglycerol kinase	Mitochondrial membrane	Lipid kinase that can phosphorylate both monoacylglycerol and diacylglycerol to form lysophosphatidic acid (LPA) and phosphatidic acid (PA), respectively.
Q7Z434	Mitochondrial antiviral-signaling protein	MOM +peroxisomes	Required for innate immune defense against viruses.
Q7Z434-4	Isoform 4 of Mitochondrial antiviral-signaling protein		
Q96EY7	Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3		Mitochondrial RNA-binding protein that has a role in mitochondrial translation.
Q96EY7-2	Isoform 2 of Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3		
Q9BXX5	Bcl-2-like protein 13	Mitochondrial membrane	May promote the activation of caspase-3 and apoptosis.
Q9BXX5-4	Isoform 3 of Bcl-2-like protein 13	+ nucleus	
Q9H0R6	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A		Allows the formation of correctly charged Gln-tRNA(Gln) through the transamidation of misacylated Glu-tRNA(Gln) in the mitochondria.
Q9H0R6-2	Isoform 2 of Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A		
Q9NX20	39S ribosomal protein L16		Component of the large subunit of mitochondrial ribosome.
Q9Y3I1	F-box only protein 7	+Nucleus +Cytoplasm	Substrate recognition component of a SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubiquitin-protein ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins,
Q9Y3I1-2	Isoform 2 of F-box only protein 7		
Q9Y3I1-3	Isoform 3 of F-box only protein 7		

**ER**

Accession	Name	Localization	Function
O15270	Serine palmitoyltransferase 2		Serine palmitoyltransferase (SPT).
O43681	ATPase ASNA1	+nucleus +cytoplasm	ATPase required for the post-translational delivery of tail-anchored (TA) proteins to the endoplasmic reticulum.
O60762	Dolichol-phosphate mannosyltransferase		Transfers mannose from GDP-mannose to dolichol monophosphate to form dolichol phosphate mannose (Dol-P-Man)
P62820-2	Isoform 2 of Ras-related protein Rab-1A	+Golgi +Cytoplasm	The small GTPases Rab are key regulators of intracellular membrane trafficking, from the formation of transport vesicles to their fusion with membranes.
P62820-3	Isoform 3 of Ras-related protein Rab-1A	+membrane +Early endosome	
Q6NUQ1	RAD50-interacting protein 1	+Cytoplasm	Involved in regulation of membrane traffic between the Golgi and the endoplasmic reticulum.
Q8NHH9	Atlastin-2	ER membrane	GTPase tethering membranes through formation of trans-homooligomers and mediating homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. Functions in endoplasmic reticulum tubular network biogenesis.
Q8NHH9-2	Isoform 2 of Atlastin-2		
Q8NHH9-3	Isoform 2 of Atlastin-3		
Q8NHH9-4	Isoform 2 of Atlastin-4		
Q96CS3	FAS-associated factor 2	+Cytoplasm	May play a role in the translocation of terminally misfolded proteins from the endoplasmic reticulum lumen to the cytoplasm and their degradation by the proteasome.
Q96JJ7	Protein disulfide-isomerase TMX3	ER membrane	Probable disulfide isomerase, which participates in the folding of proteins containing disulfide bonds. May act as a dithiol oxidase
Q96LJ7	Dehydrogenase/reductase SDR family member 1		
Q9BT22	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	ER membrane	Participates in the formation of the lipid-linked precursor oligosaccharide for N-glycosylation. Involved in assembling the dolichol-pyrophosphate-GlcNAc(2)-Man5 intermediate on the cytoplasmic surface of the ER
Q9Y673	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	ER membrane	Catalytic activity: UDP-glucose + dolichyl phosphate = UDP + dolichyl beta-D-glucosyl phosphate.
Q9Y673-2	Isoform 2 of Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase		
Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein	+ Cytoplasmic vesicles	Plays a role in the organization of endoplasmic reticulum exit sites. Specifically binds to phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) and phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P)
Q9Y6Y8-2	Isoform 2 of SEC23-interacting protein		

**NUCLEUS**

Accession	Name	Localization	Function
O00541	Pescadillo homolog		Component of the PeBoW complex, which is required for maturation of 28S and 5.8S ribosomal RNAs and formation of the 60S ribosome
O00541-2	Isoform 2 of Pescadillo homolog		
O43482	Protein Mis18-beta		Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal chromosome segregation during mitosis
O94829	Importin-13	+Cytoplasm	Mediates the nuclear import of UBC9, the RBM8A/MAGOH complex, PAX6 and probably other members of the paired homeobox family. Also mediates nuclear export of eIF-1A, and the cytoplasmic release of eIF-1A is triggered by the loading of import substrates onto IPO13.
P08047	Transcription factor Sp1	+Cytoplasm	Transcription factor that can activate or repress transcription in response to physiological and pathological stimuli
P19525	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	+Cytoplasm	IFN-induced dsRNA-dependent serine/threonine-protein kinase which plays a key role in the innate immune response to viral infection and is also involved in the regulation of signal transduction, apoptosis, cell proliferation and differentiation.
P19525-2	Isoform 2 of Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase		
P40937	Replication factor C subunit 5		The elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon requires the action of the accessory proteins proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and activator 1.
P40937-2	Isoform 2 of Replication factor C subunit 5		
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	+Cytoplasm	Inhibits GTP exchange on Ran. Forms a Ran-GTP-RANBP1 trimeric complex. Increase GTP hydrolysis induced by the Ran GTPase activating protein RANGAP1.
P50148	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	Nucleus membrane	Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. Regulates B-cell selection and survival and is required to prevent B-cell-dependent autoimmunity. Regulates chemotaxis of BM-derived neutrophils and dendritic cells (in vitro)
P50995	Annexin A11	+Cytoplasm	Binds specifically to calyculin in a calcium-dependent manner (By similarity). Required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis.
P56545	C-terminal-binding protein 2	+ Cell junction (synapse)	Corepressor targeting diverse transcription regulators. Functions in brown adipose tissue (BAT) differentiation (By similarity)
P56545-2	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 2		

P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	+Cytoplasm	Essential component of the COP9 signalosome complex (CSN), a complex involved in various cellular and developmental processes.
P61201-2	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 2		
P63165	Small ubiquitin-related modifier 1	+Cytoplasm	Ubiquitin-like protein that can be covalently attached to proteins as a monomer or a lysine-linked polymer.
P67775-2	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	+Cytoplasm	PP2A is the major phosphatase for microtubule-associated proteins (MAPs). PP2A can modulate the activity of phosphorylase B kinase casein kinase 2, mitogen-stimulated S6 kinase, and MAP-2 kinase. Cooperates with SGOL2 to protect centromeric cohesin from separase-mediated cleavage in oocytes specifically during meiosis I (By similarity). Can dephosphorylate SV40 large T antigen and p53/TP53. Activates RAF1 by dephosphorylating it at 'Ser-259'.
Q04206	Transcription factor p65		NF-kappa-B is a pleiotropic transcription factor present in almost all cell types and is the endpoint of a series of signal transduction events that are initiated by a vast array of stimuli related to many biological processes such as inflammation, immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis and apoptosis. NF-kappa-B is a homo- or heterodimeric complex formed by the Rel-like domain-containing proteins RELA/p65, RELB, NFKB1/p105, NFKB1/p50, REL and NFKB2/p52 and the heterodimeric p65-p50 complex appears to be most abundant one.
Q04206-2	Isoform 2 of Transcription factor p65		
Q04206-3	Isoform 3 of Transcription factor p65		
Q04206-4	Isoform 4 of Transcription factor p65		
Q13363	C-terminal-binding protein 1	+Cytoplasm	Corepressor targeting diverse transcription regulators such as GLIS2 or BCL6. Has dehydrogenase activity. Involved in controlling the equilibrium between tubular and stacked structures in the Golgi complex. Functions in brown adipose tissue (BAT) differentiation
Q13363-2	Isoform 2 of C-terminal-binding protein 1		
Q15631	Translin	+Cytoplasm	DNA-binding protein that specifically recognizes consensus sequences at the breakpoint junctions in chromosomal translocations, mostly involving immunoglobulin (Ig)/T-cell receptor gene segments.
Q15631-2	Isoform 2 of Translin		
Q86WJ1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like		DNA helicase which plays a role in chromatin-remodeling following DNA damage
Q86WJ1-2	Isoform 2 of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like		
Q86WJ1-3	Isoform 3 of Chromodomain-		

	helicase-DNA-binding protein 1-like		
Q86WJ1-4	Isoform 4 of Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like		
Q8WVB6-3	Isoform 3 of Chromosome transmission fidelity protein 18 homolog		Chromosome cohesion factor involved in sister chromatid cohesion and fidelity of chromosome transmission.
Q8WXX5	DnaJ homolog subfamily C member 9		
Q96J01	THO complex subunit 3		Required for efficient export of polyadenylated RNA and spliced mRNA.
Q9BTT0-2	Isoform 2 of Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	+Cytoplasm	Histone chaperone that specifically mediates the genome-wide removal of histone H2A.Z/H2AFZ from the nucleosome: removes H2A.Z/H2AFZ from its normal sites of deposition, especially from enhancer and insulator regions.
Q9BWH6	RNA polymerase II-associated protein 1		Forms an interface between the RNA polymerase II enzyme and chaperone/scaffolding protein, suggesting that it is required to connect RNA polymerase II to regulators of protein complex formation.
Q9BWH6-2	Isoform 2 of RNA polymerase II-associated protein 1		
Q9BWH6-3	Isoform 3 of RNA polymerase II-associated protein 1		
Q9BXP5	Serrate RNA effector molecule homolog	+Cytoplasm	Acts as a mediator between the cap-binding complex (CBC) and the primary microRNAs (miRNAs) processing machinery during cell proliferation. Contributes to the stability and delivery of capped primary miRNA transcripts to the primary miRNA processing complex containing DGCR8 and DROSHA, thereby playing a role in RNA-mediated gene silencing (RNAi) by miRNAs. Binds capped RNAs (m7GpppG-capped RNA). Involved in cell cycle progression at S phase. necessary and sufficient to promote neural stem cell self-renewal.
Q9BXP5-2	Isoform 2 of Serrate RNA effector molecule homolog		
Q9BXP5-3	Isoform 3 of Serrate RNA effector molecule homolog		
Q9BXP5-4	Isoform 4 of Serrate RNA effector molecule homolog		
Q9BXP5-5	Isoform 5 of Serrate RNA effector molecule homolog		
Q9BY41		+Cytoplasm	Responsible for the deacetylation of lysine residues on the N-terminal part of the core histones (H2A, H2B, H3 and H4).
Q9BY41-4	Histone deacetylase 8		
Q9H9Q2	COP9 signalosome complex subunit 7b	+Cytoplasm	Component of the COP9 signalosome complex (CSN), a complex involved in various cellular and developmental processes.
Q9H9Q2-3	Isoform 3 of COP9 signalosome complex subunit 7b		
Q9NP77-2	Isoform 2 of RNA polymerase II subunit A	+Cytoplasm	Protein phosphatase that catalyzes the dephosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. Plays a role in RNA processing and termination. Plays a role in

			pre-mRNA polyadenylation via its interaction with SYMPK.
Q9NZ71	Regulator of telomere elongation helicase 1		ATP-dependent DNA helicase implicated in telomere-length regulation, DNA repair and the maintenance of genomic stability.
Q9NZ71-2	Isoform 2 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-4	Isoform 4 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-5	Isoform 5 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-6	Isoform 6 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-7	Isoform 7 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-8	Isoform 8 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9NZ71-9	Isoform 9 of Regulator of telomere elongation helicase 1		
Q9P287	BRCA2 and CDKN1A-interacting protein		
Q9P287-2	Isoform 2 of BRCA2 and CDKN1A-interacting protein		
Q9P287-3	Isoform 3 of BRCA2 and CDKN1A-interacting protein		
Q9P287-4	Isoform 4 of BRCA2 and CDKN1A-interacting protein		
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	+Cytosol +Membrane	Implicated in immunoproteasome assembly and required for efficient antigen processing. The PA28 activator complex enhances the generation of class I binding peptides by altering the cleavage pattern of the proteasome
Q9Y4B6	Protein VPRBP	+Cytoplasm	Acts both as a substrate recognition component of E3 ubiquitin-protein ligase complexes and as an atypical serine/threonine-protein kinase, playing key roles in various processes such as cell cycle, telomerase regulation and histone modification.
Q9Y4B6-2	Isoform 2 of Protein VPRBP		
Q9Y4B6-3	Isoform 3 of Protein VPRBP		

**UBIQUITININ RELATED PROTEINS**

Accession	Name	Localization	Function
P63165	Small ubiquitin-related modifier 1	Nucleus Cytoplasm	Ubiquitin-like protein that can be covalently attached to proteins as a monomer or a lysine-linked polymer.
Q5T447	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	Cytoplasm	E3 ubiquitin ligases accepts ubiquitin from an E2 ubiquitin-conjugating enzyme in the form of a thioester and then directly transfers the ubiquitin to targeted substrates.
Q6UWE0	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1	Cytoplasm	E3 ubiquitin-protein ligase that mediates monoubiquitination of TSG101 at multiple sites, leading to inactivate the ability of TSG101 to sort endocytic (EGF receptors) and exocytic (HIV-1 viral proteins) cargos.
Q6UWE0-2	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1		
Q7Z7E8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1		Catalyzes the covalent attachment of ubiquitin to other proteins.
Q8IZ07	Ankyrin repeat domain-containing protein 13A	Cell membrane, Late endosome	Ubiquitin-binding protein that specifically recognizes and binds 'Lys-63'-linked ubiquitin.
O95352	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	Cytoplasm	E1-like activating enzyme involved in the 2 ubiquitin-like systems required for cytoplasm to vacuole transport (Cvt) and autophagy.
O95352-2	Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7		
O95352-3	Isoform 3 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7		
Q96RU2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28	Nucleus, nucleoplasm	Deubiquitinase involved in DNA damage response checkpoint and MYC proto-oncogene stability.
Q96RU2-2	Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 28		
Q99436	Proteasome subunit beta type-7	Cytoplasm	The proteasome is a multicatalytic proteinase complex which is characterized by its ability to cleave peptides with Arg, Phe, Tyr, Leu, and Glu adjacent to the leaving group at neutral or slightly basic pH. The proteasome has an ATP-dependent proteolytic activity. This unit is responsible of the trypsin-like activity
Q9Y3I1	F-box only protein 7	Mitochondria	Substrate recognition component of a SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubiquitin-protein ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins,
Q9Y3I1-2	Isoform 2 of F-box only protein 7	Nucleus Cytoplasm	
Q9Y3I1-3	Isoform 3 of F-box only protein 7		
Q9Y4B6	Protein VPRBP	Nucleus	Acts both as a substrate recognition component of E3 ubiquitin-protein ligase complexes and as an atypical serine/threonine-protein kinase, playing key roles in various processes such as cell cycle,
Q9Y4B6-2	Isoform 2 of Protein VPRBP	Cytoplasm	
Q9Y4B6-3	Isoform 3 of Protein VPRBP		

			telomerase regulation and histone modification.
--	--	--	---

**OTHERS**

Accession	Name	Localization	Function
A6NDU8	UPF0600 protein C5orf51		
O14964	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Cytoplasm Early endosome membrane	Involved in intracellular signal transduction mediated by cytokines and growth factors.
O14964-2	Isoform 2 of Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Peripheral membrane	
O15126	Secretory carrier-associated membrane protein 1	Golgi	Functions in post-Golgi recycling pathways. Acts as a recycling carrier to the cell surface.
O15126-2	Isoform 2 of Secretory carrier-associated membrane protein 1		
O43156	TELO2-interacting protein 1 homolog	Cytoplasm	Regulator of the DNA damage response (DDR). Part of the TTT complex that is required to stabilize protein levels of the phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase (PIKK) family proteins.
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	Membrane	Co-chaperone of Hsc70
O75891	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Cytoplasm	Catalytic activity: 10-formyltetrahydrofolate + NADP <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O = tetrahydrofolate + CO <sub>2</sub> + NADPH.
O75891-3	Isoform 3 of Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase		
O95396	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3	Cytoplasm	Plays a central role in 2-thiolation of mcm5S2U at tRNA wobble positions of cytosolic tRNA(Lys), tRNA(Glu) and tRNA(Gln). Also essential during biosynthesis of the molybdenum cofactor.
O95671	N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein	Cytoplasm	Unknown. The presence of the putative catalytic domain of S-adenosyl-L-methionine binding argues for a methyltransferase activity.
O95671-2	Isoform 2 of N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein		
O95671-3	Isoform 3 of N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein		



O95837	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14	Plasma membrane Exosomes	Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems.
P08247	Synaptophysin	Cytoplasmic vesicles, Cell Junctions (synapses)	Possibly involved in structural functions as organizing other membrane components or in targeting the vesicles to the plasma membrane. Involved in the regulation of short-term and long-term synaptic plasticity (By similarity)
P29992	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	Cell membrane, Cytoplasm	Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are involved as modulators or transducers in various transmembrane signaling systems. Acts as an activator of phospholipase C.
P46020	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	Cell membrane cytoplasmic side	Phosphorylase b kinase catalyzes the phosphorylation of serine in certain substrates, including troponin I. The alpha chain may bind calmodulin.
P46020-2	Isoform 2 of Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform		
P46020-3	Isoform 3 of Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform		
P48507	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	Cytosol	Sulfur metabolism; glutathione biosynthesis; glutathione from L-cysteine and L-glutamate: step 1/2.
P54840	Glycogen [starch] synthase, liver	Cytoplasm, Cytoeskeleton	Transfers the glycosyl residue from UDP-Glc to the non-reducing end of alpha-1,4-glucan.
Q03426	Mevalonate kinase	Cytoplasm	May be a regulatory site in cholesterol biosynthetic pathway.
Q08AM6	Protein VAC14 homolog	Endosome and microsome membrane	Acts as a positive activator of PIKfyve kinase activity. Also required to maintain normal levels of phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P). Plays a role in the biogenesis of endosome carrier vesicles (ECV) / multivesicular bodies (MVB) transport intermediates from early endosomes
Q0VDF9	Heat shock 70 kDa protein 14	Cytoplasm	Component of the ribosome-associated complex (RAC), a complex involved in folding or maintaining nascent polypeptides in a folding-competent state.
Q5ZPR3-2	Isoform 2 of CD276 antigen	Membrane	May participate in the regulation of T-cell-mediated immune response.
Q66K14	TBC1 domain family member 9B	Membrane	May act as a GTPase-activating protein for Rab family protein(s).

Q66K14-2	Isoform 2 of TBC1 domain family member 9B		
Q6P996	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	Golgi	
Q71RC2	La-related protein 4	Membrane	Plays a role in the regulation of cell morphology and cytoskeletal organization
Q71RC2-2	Isoform 2 of La-related protein 4		
Q71RC2-3	Isoform 3 of La-related protein 4		
Q71RC2-4	Isoform 4 of La-related protein 4		
Q71RC2-5	Isoform 5 of La-related protein 4		
Q71RC2-7	Isoform 7 of La-related protein 4		
Q7Z2T5	TRMT1-like protein		May play a role in motor coordination and exploratory behavior
Q86TX2	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	Cytoplasm	Acyl-CoA thioesterases are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of acyl-CoAs to the free fatty acid and coenzyme A (CoASH), providing the potential to regulate intracellular levels of acyl-CoAs, free fatty acids and CoASH. Active towards fatty acyl-CoA with chain-lengths of C12-C16 (By similarity)
Q8NCE2	Myotubularin-related protein 14	Cytoplasm	Lipid phosphatase which efficiently dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and PtdIns(3,5)P2; inactive toward PtdIns4P, PtdIns(3,4)P2, PtdIns(4,5)P2 and PtdIns(3,4,5)P3.
Q8NCE2-2	Isoform 2 of Myotubularin-related protein 14		
Q8NCE2-3	Isoform 3 of Myotubularin-related protein 14		
Q8NHP6	Motile sperm domain-containing protein 2	Membrane	
Q8NHP6-2	Isoform 2 of Motile sperm domain-containing protein 2		
Q8TC07	TBC1 domain family member 15	Cytoplasm	Acts as a GTPase activating protein for RAB7A. Does not act on RAB4, RAB5 or RAB6 (By similarity).
Q8TC07-2	Isoform 2 of TBC1 domain family member 15		
Q8TC07-3	Isoform 3 of TBC1 domain family member 15		
Q8WTV0-2	Isoform 1 of Scavenger receptor class B member 1	Cell membrane	Receptor for different ligands such as phospholipids, cholesterol ester, lipoproteins, phosphatidylserine and apoptotic cells.
Q8WTV0-3	Isoform 3 of Scavenger receptor class B member 1		

Q8WTV0-4	Isoform 4 of Scavenger receptor class B member 1		
Q96C36	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	Cytoplasm	Housekeeping enzyme that catalyzes the last step in proline biosynthesis.
Q96GA7	Serine dehydratase-like	Extracellular vesicular exosome	
Q96HU8	GTP-binding protein Di-Ras2	Cell membrane cytoplasmic side	Displays low GTPase activity and exist predominantly in the GTP-bound form
Q99829	Copine-1	Extracellular vesicular exosome	May function in membrane trafficking. Exhibits calcium-dependent phospholipid binding properties.
Q9BSF4	Uncharacterized protein C19orf52		
Q9C0B7	Transport and Golgi organization protein 6 homolog	Membrane	
Q9GZT4	Serine racemase	Cytoplasm, Plasma membrane	Catalyzes the synthesis of D-serine from L-serine. D-serine is a key coagonist with glutamate at NMDA receptors. Has dehydratase activity towards both L-serine and D-serine
Q9H115	Beta-soluble NSF attachment protein	Membrane	Required for vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.
Q9H1E5	Thioredoxin-related transmembrane protein 4	Membrane	
Q9NQW7-3	Isoform 3 of Xaa-Pro aminopeptidase 1	Cytoplasm	Contributes to the degradation of bradykinin. Catalyzes the removal of a penultimate prolyl residue from the N-termini of peptides, such as Arg-Pro-Pro
Q9NX40	OCIA domain-containing protein 1	Endosome	
Q9NX40-2	Isoform 2 of OCIA domain-containing protein 1		
Q9NX40-3	Isoform 3 of OCIA domain-containing protein 1		
Q9NX40-4	Isoform 4 of OCIA domain-containing protein 1		
Q9UIQ6	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	Cell membrane	Release of an N-terminal amino acid, cleaves before cysteine, leucine as well as other amino acids. Degrades peptide hormones such as oxytocin, vasopressin and angiotensin III, and plays a role in maintaining homeostasis during pregnancy. May be involved in the inactivation of neuronal peptides in the brain. Cleaves Met-enkephalin and dynorphin. Binds
Q9UIQ6-2	Isoform 2 of Leucyl-cystinyl aminopeptidase		
Q9UIQ6-3	Isoform 3 of Leucyl-cystinyl aminopeptidase		

			angiotensin IV and may be the angiotensin IV receptor in the brain
Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	Cytosol, Membrane, Exosome	Implicated in immunoproteasome assembly and required for efficient antigen processing.
Q9UNS2	COP9 signalosome complex subunit 3		Component of the COP9 signalosome complex (CSN), a complex involved in various cellular and developmental processes.
Q9UNS2-2	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 3		
Q9Y2Z9	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase	Golgi	
Q9Y2Z9-2	Isoform 2 of Ubiquinone biosynthesis monooxygenase		
Q9Y2Z9-3	Isoform 3 of Ubiquinone biosynthesis monooxygenase		
Q9Y3P9	Rab GTPase-activating protein 1	Cytoplasm	May act as a GTPase-activating protein of RAB6A. May play a role in microtubule nucleation by centrosome. May participate in a RAB6A-mediated pathway involved in the metaphase-anaphase transition.
Q9Y3P9-2	Isoform 2 of Rab GTPase-activating protein 1		
Q9Y3P9-3	Isoform 3 of Rab GTPase-activating protein 1		
Q9Y6I9	Testis-expressed sequence 264 protein	Secreted	

Among all the proteins identified by mass spectrometry we wish to call attention in the following three different types of proteins.

- 1) The mitochondrial BCL2 family members BAK (Q16611) and BCL-Rambo (Q9BXX5). Since protein:protein interactions among different BCL2 family members are recognized as the main regulators of their activity, and considering that we did not explicitly examine the capacity of BOK $\Delta$ C6His to interact with BAK or BCL-Rambo, the potential interaction of BOK with BAK and with BCL-Rambo deserves further study .
- 2) Atlastin. This is a GTPase that functions in ER tubular network biogenesis, being implicated in ER membrane tethering and tubulation (Orso *et al.*, 2009). In a recent publication from Echeverry *et al.* (Echeverry *et al.*, 2013), the authors presented evidence that BOK induces remodeling of ER and Golgi, but the underlying mechanism was not elucidated. It is tempting to speculate that BOK may regulate ER morphology by modulating the function of atlastin via direct interaction.
- 3) Finally, we would like also to point out that a large number of proteins related to the ubiquitin/proteasome pathway were identified as GFP-BOK interacting partners in co-IP

assays. Our data are in agreement with previous observations done by Schulman *et al.* indicating that persistent activation of inositol 1,4,5-trisphosphate (I<sub>3</sub>P)-dependent cell signalling causes BOK degradation by the ubiquitin-proteasome pathway (Schulman *et al.*, 2013). Curiously, in that same paper the I<sub>3</sub>P receptor was identified as the main binding partner of BOK by co-IP, but we did not detect such interaction here.

Finally, we wish to point here as a cautionary note that the potential BOK-binding partners described above should be confirmed by an independent approach (IP with appropriate antibodies, etc) before reaching any conclusion about their physiological relevance. Additionally, in case any of these BOK-interacting partners can be further validated, the functional relevance of such protein:protein interaction should also be assessed.

### 3.4.4 DISCUSSION

Although BOK was identified almost two decades ago, it remains as one of the least understood BCL2 family members. Because BOK present certain similarities with BAX/BAK, it has been often been assumed that BOK is functionally and mechanistically redundant with BAX/BAK. However, this assumption remains to be explicitly proven. Here, we present distinct lines of evidence indicating that the cellular behaviour of BOK shares some common features but also important differences with BAX/BAK.

Regarding BOK intracellular distribution, our results support a dual mitochondrial and ER localization for the protein under normal conditions. This is clearly distinct from the primarily cytosolic localization adopted by BAX under unstressed conditions, but resembles to some extent the intracellular distribution found for BAK under healthy conditions, although BAK appears to be more strongly attached to intracellular membranes than BOK. The differential intracellular distribution of BOK, BAX, and BAK may be at least partially due to distinct characteristics of their C-terminal hydrophobic segments that purportedly act as membrane-targeting and membrane-anchoring domains (Bartholomeusz *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005; Lindsay *et al.*, 2011, Yakovlev *et al.*, 2004). Of note, the BOK C-terminal hydrophobic region does not fit the consensus for atypical mitochondrial-targeting or ER-targeting sequence (Lindsay *et al.*, 2011). Interestingly, in the absence of both BAX and BAK, the mitochondrial localization of BOK was partially lost while its ER-localization remained unaltered. Although the underlying cause of the latter phenomenon remains to be determined several scenarios can be envisioned. One possibility is that MOM-localized BAK may act as a receptor for BOK, as recently showed for the case of BAX. In support of this possibility, we identified BAK as a binding partner of GFP-BOK by co-IP assays. It is also conceivable that elimination of BAX and BAK may indirectly affect other

mitochondrial proteins or mitochondrial lipid constituents that participate in targeting and/or anchoring BOK to the MOM. On the other hand, the finding that BOK localization at the ER does not depend on BAX/BAK suggests that ER-localized and MOM-localized BOK display different requirements for targeting to each organelle. In fact, BOK has been recently proposed to interact with I<sub>3</sub>P receptors at the ER, and this type of protein:protein interaction has also been previously described for BAX and BAK and other BCL2 family members. Considering the dual mitochondrial/ER localization of BOK, we also wish to mention here the possibility that BOK may be localized to MOM-ER contact sites (MAM) playing critical roles in ER-mitochondria cross-talk during cell death.

Consistent with recent studies, we confirmed that the mere overexpression of BOK is deleterious for cell viability (Echeverry *et al.*, 2013). Not only this, BOK overexpression sensitized cells to STS, a classical apoptotic stimulus. However, in contrast to Echeverry *et al.*, in our hands BOK overexpression produced cyt c release in MEF BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> cells, indicating that BOK does not strictly require BAX or BAK to elicit apoptosis, and that (partial) loss of BOK-mitochondrial localization does not abolish BOK-induced apoptosis. These observations advocate that (i) a relatively small amount of mitochondrial BOK is sufficient to induce cyt c release, and/or (ii) that BOK can induce cyt c release indirectly through the ER (Heath-Engel *et al.*, 2008; Klee *et al.*, 2009; Nutt *et al.*, 2002; Oakes *et al.*, 2005, 2003; Scorrano *et al.*, 2003; Zong *et al.*, 2003). The question is: How could MOM- or ER-localized BOK induce cyt c release independently of BAX/BAK? One possibility is that BOK may possess a BAX-like pore-forming function that could be unleashed under certain conditions thereby porating the MOM to allow cyt c release (see Chapter 3.3). It is also conceivable that ER-localized BOK may affect the function of I<sub>3</sub>P receptors in such a manner as to induce release of Ca<sup>2+</sup> from the ER. Accumulation of calcium at the mitochondrion could then trigger the opening of the Permeability Transition Pore (PTP) leading to mitochondrial swelling and cyt c release (Marzo *et al.*, 1998).

We also report that BOK overexpression leads to abnormalities in mitochondrial morphology. The mitochondrial morphological changes induced by BOK did not appear to be directly linked to BOK-induced apoptosis. Despite intense research effort, whether or not components of the mitochondrial dynamics machinery participate in the BCL2-regulated apoptotic pathway still remains a matter of debate. Interestingly, BOK has been reported to induce fragmentation of ER and Golgi compartments, although it remains unclear what is the precise connection, if any, between such BOK activities and BOK-induced apoptosis (Echeverry *et al.*, 2013). Clearly, further experimentation is required to clarify this issue. Another important point that should be addressed by future work is the molecular mechanism by which BOK induces mitochondrial

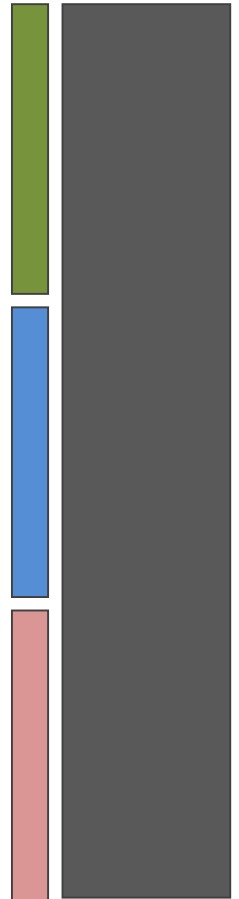
morphological changes. Since this activity of BOK appears to be DRP1-independent, it is conceivable that BOK may modulate mitochondrial dynamics by interacting with mitofusins, as previously proposed for BAK. Of note, MFN2 is enriched at ER-mitochondrial MAM. However, MFN2 did not co-IP with GFP-BOK in detergent-treated cellular extracts. Another more provocative possibility is that BOK may affect mitochondrial dynamics by directly remodelling the mitochondrial membrane lipid bilayer structure. In line with this, we present several lines of evidence indicating that BOK $\Delta$ C6His induces lipid mixing, fusion and fragmentation of CL-rich liposomal membranes. Interestingly, under the same experimental conditions, BAX and BAK $\Delta$ C did not induce such membrane-remodelling processes in CL-rich liposomes.

Finally, by using co-IP and mass spectrometry, we identified multiple candidates with potential to interact with BOK in the intracellular environment. One interesting candidate among them is atlastin, a GTPase implicated in homotypic fusion of ER membranes (Hu *et al.*, 2009; Rismanchi *et al.*, 2008). Because BOK overexpression induces ER fragmentation (Echeverry *et al.*, 2013), it is conceivable that this effect may be mediated by a specific interaction of BOK with atlastin. Additionally, the potential interaction of BOK with BAK and BCL-Rambo identified in co-IP experiments could be related to BOK's proapoptotic activity, because BAX/BAK functional activation requires prior interaction with selected BCL2 family members. However, despite their potential interest, all these putative cellular interacting partners of BOK require to be confirmed by additional experimental approaches, together with further assessment of their functional relevance.





# ANNEX





# ANNEX

## CHAPTER 3.4:

FIGURE 1.B

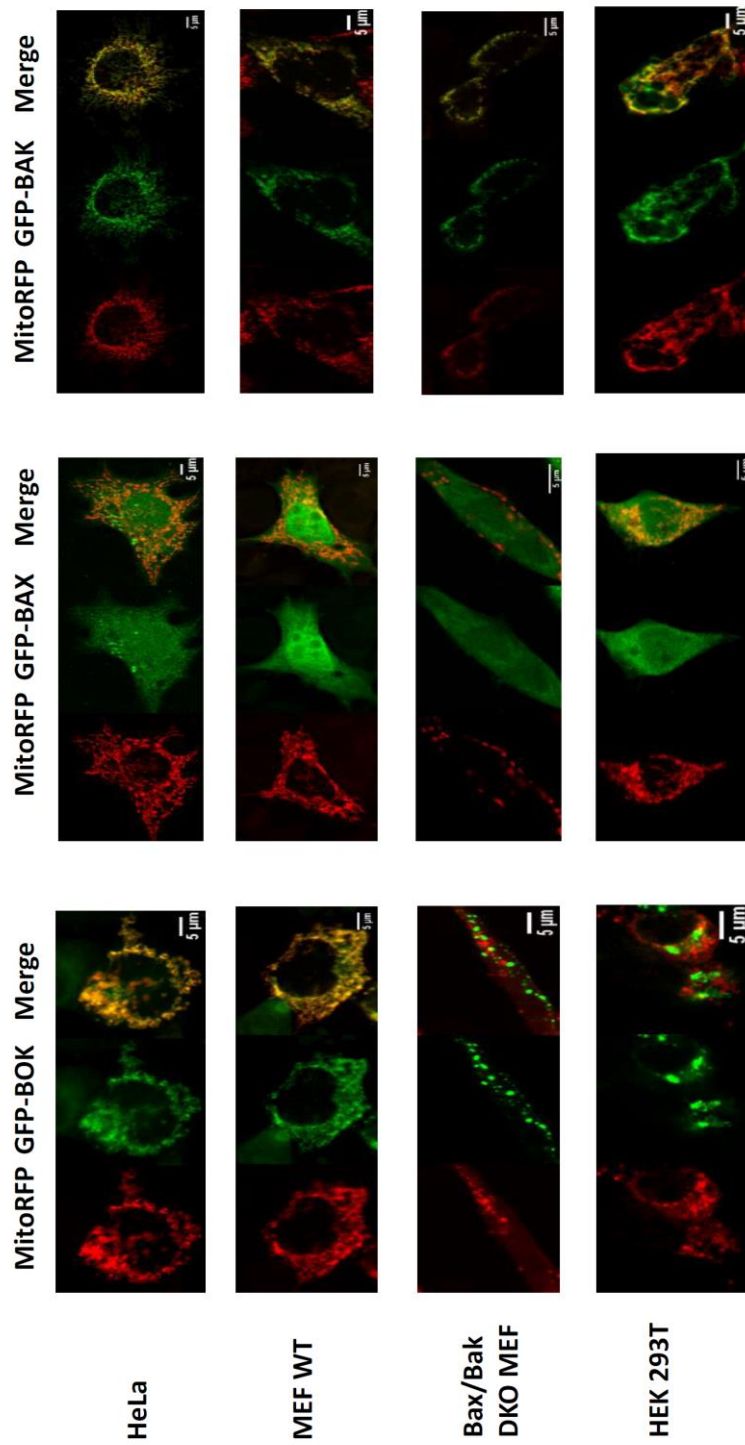




FIGURE 2C

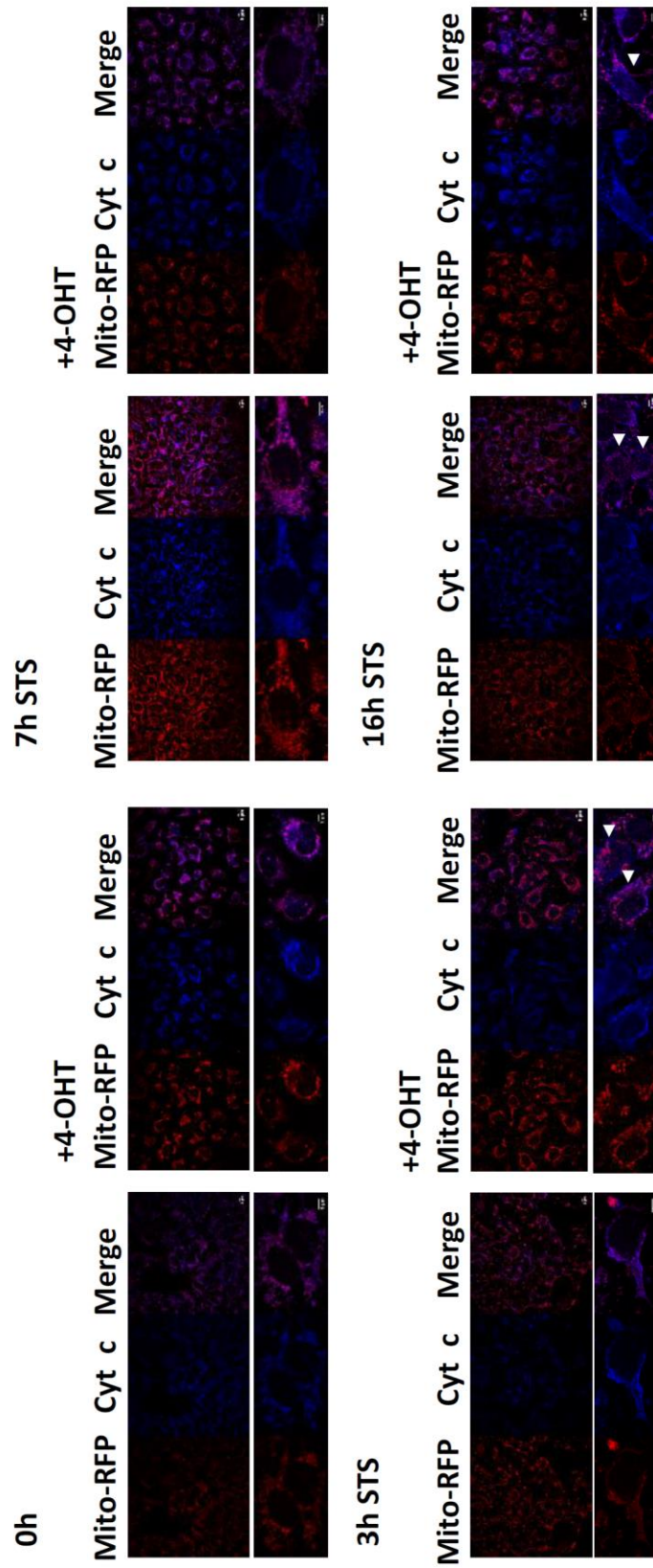
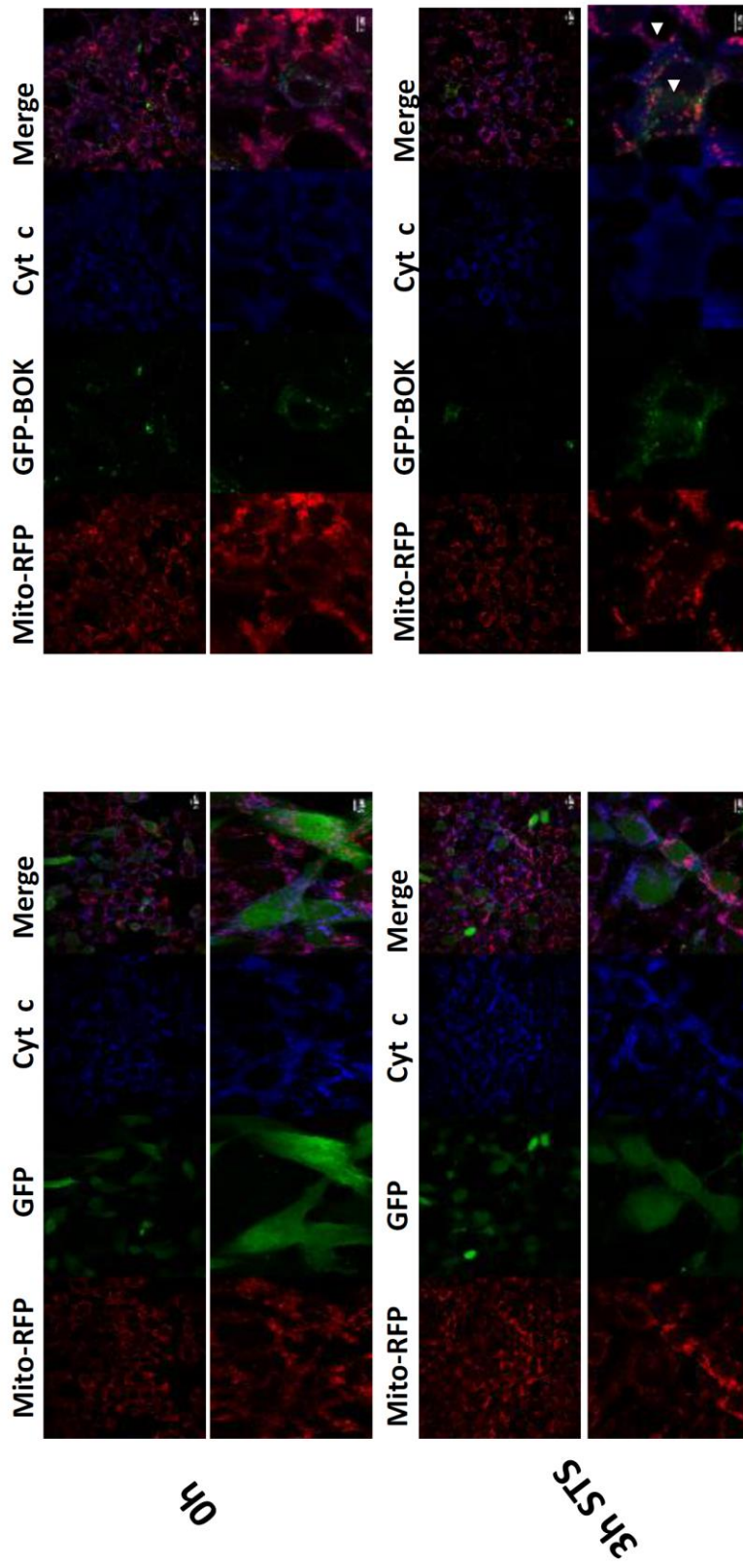
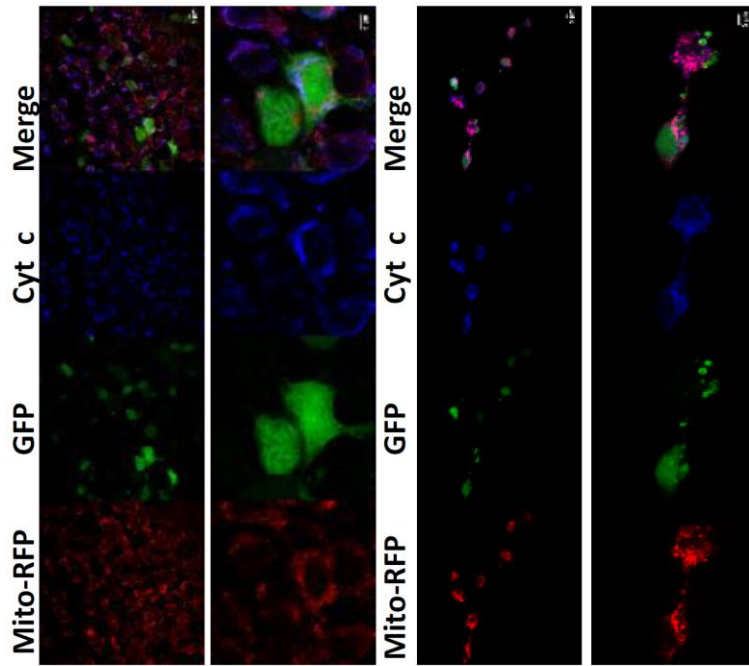
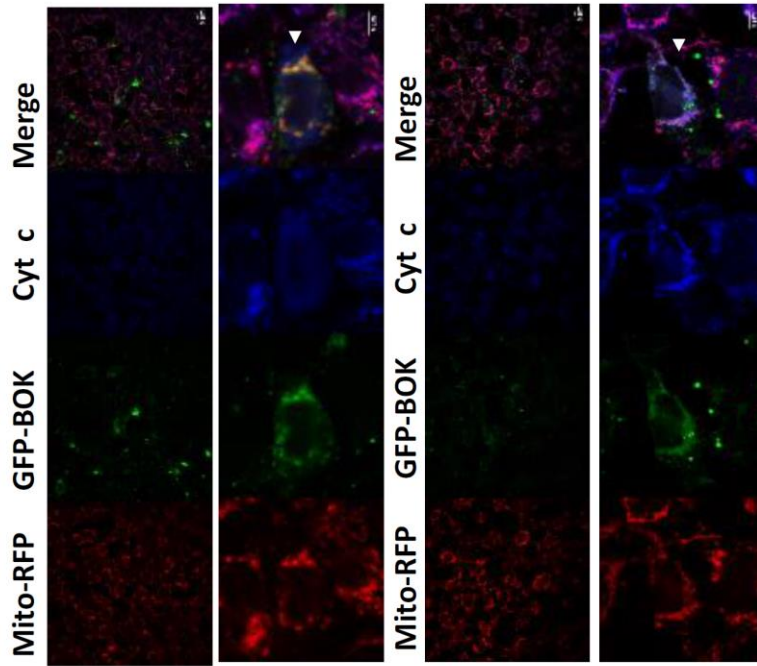


FIGURE 3C

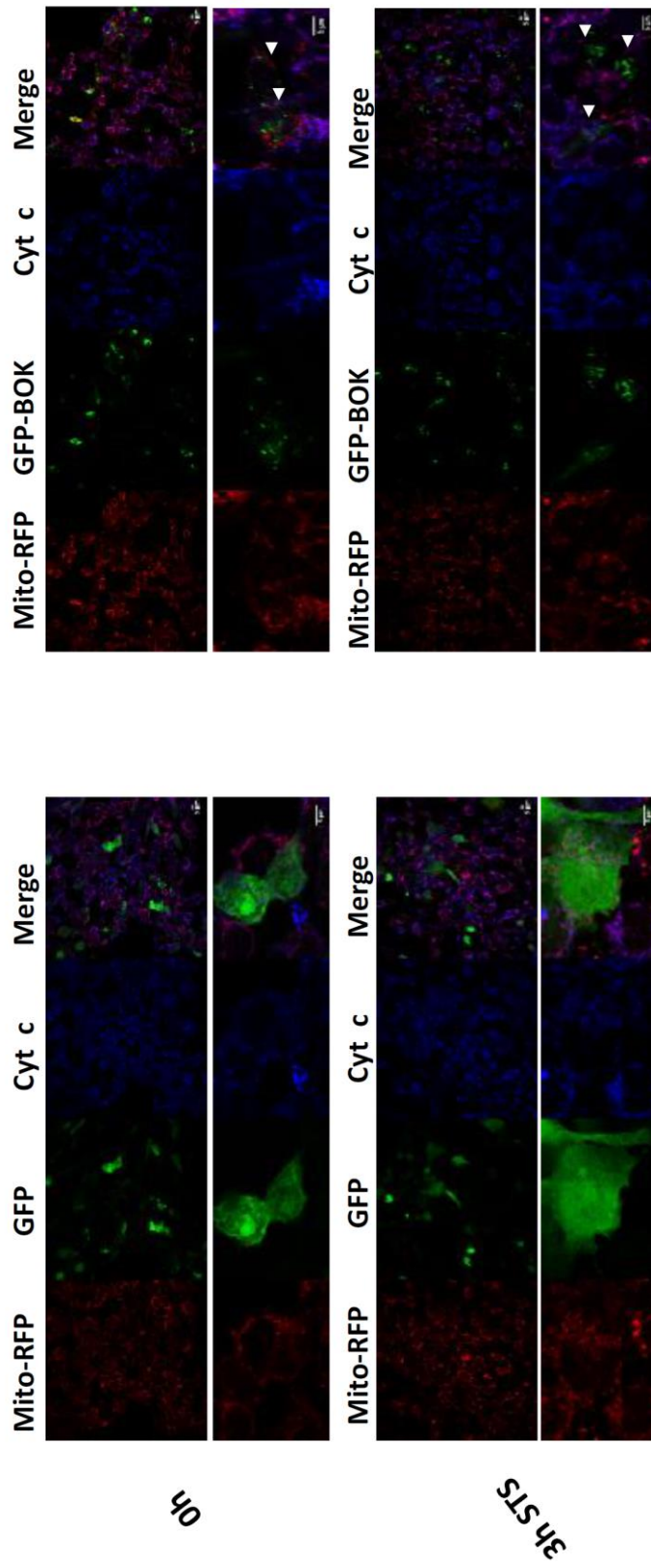




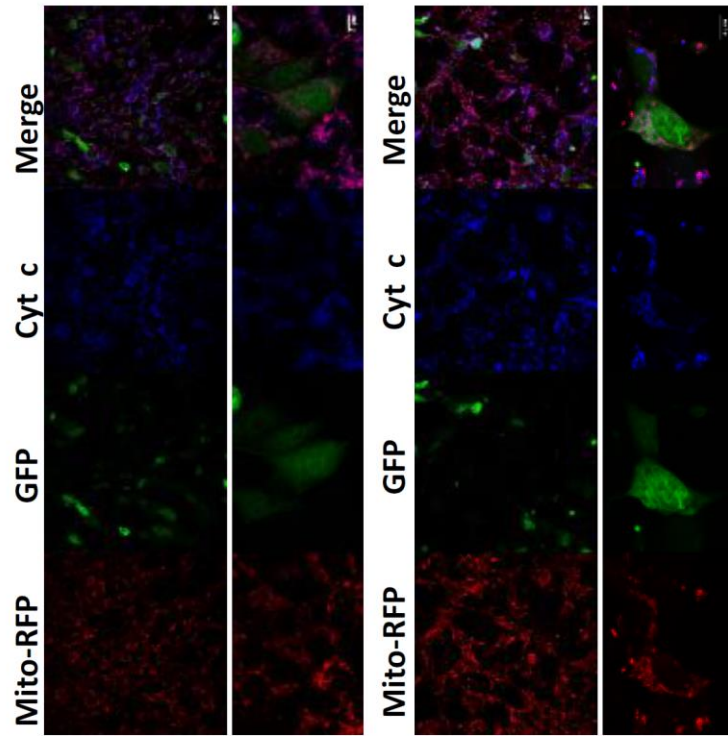
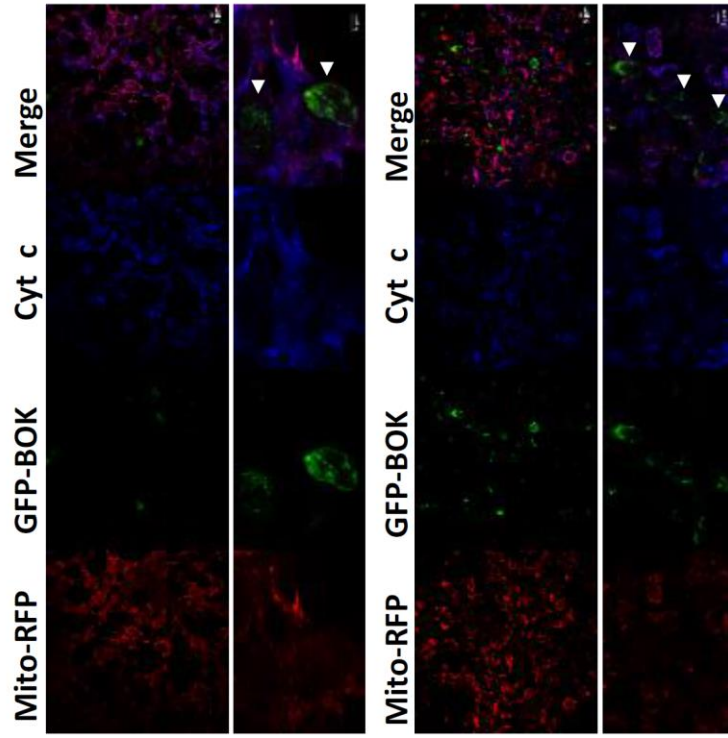
7h STS

16h STS

FIGURE 4B





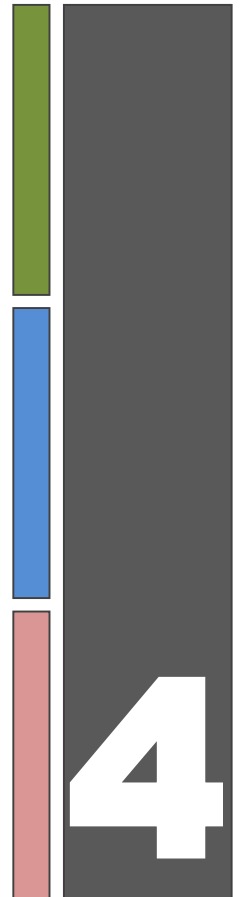


7h STS

16h STS



# CHAPTER 4: OVERVIEW AND CONCLUSIONS





## 4. OVERVIEW

It has long been known that mitochondria are the main “powerhouses” of the cell. During the last two decades, there has been a renaissance in mitochondrial research due to the discovery that these organelles are continuously dividing and fusing (e.g. mitochondrial dynamics), as well as the involvement of mitochondria in apoptotic cell death (e.g. the mitochondrial pathway of apoptosis). At the molecular level, mitochondrial dynamics are mainly under the control of dynamin-like proteins, including DRP1. These proteins possess the intrinsic capacity to reorganize membrane structure in an oligomerization and GTP hydrolysis-dependent manner. Regarding mitochondrial pathway of apoptosis, the main regulatory components are the BCL2 family proteins, which regulate the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) process allowing for the release of multiple apoptogenic factors into the cytosol. Classically, BCL2 family members are classified into three subclasses: (i) Multidomain BCL2-like antiapoptotic proteins, which inhibit MOMP; (ii) multidomain BAX-like proapoptotic effectors (BAX, BAK, and BOK), which, once activated, form large proteolipidic pores that directly cause MOMP; and (iii) BH3-only proapoptotic proteins, which trigger functional activation of BAX-type effectors. Interestingly, evidence suggests that components of the mitochondrial fission machinery, including DRP1, are implicated in MOMP, while BCL2 family proteins, including BAX-type proteins, are implicated in mitochondrial dynamics. On top of this, evidence has emerged that mitochondrial lipids also participate in mitochondrial dynamics and in MOMP, apparently in conjunction with mitochondrial-like dynamin-like proteins and members of the BCL2-family. In this regard, the dynamin-related Mgm1/OPA1 proteins have been shown to interact physically and functionally with CL. On the other hand, CL has been proposed to play an early role in the process of BAK and BAX activation.

However, despite these advances, how proteins belonging to mitochondrial dynamics apparatus and the BCL2 family operate is still unclear. In this Thesis, we tried to advance in our understanding of the molecular mechanisms of action of BCL2 family protein BOK and dynamin-related protein DRP1, particularly in a bilayer membrane context. We employed simplified model systems to avoid the complexity of the cellular milieu to gain further insight into the molecular specificity and functional consequences of the DRP1:CL interaction and to elucidate the molecular mechanisms underlying BOK functional activation.

Regarding DRP1 protein, in the first part of this thesis, we demonstrate that DRP1 exhibits preferential binding to CL compared to other anionic phospholipids as assessed by four different

lipid binding techniques, lipid dot-blot, sucrose floating up, monolayers and SPR. In all these experiments DRP1 was able to bind to anionic phospholipids, but it showed always preferential binding for CL. Taking into account that the same net negative charge was reproduced in all conditions tested in SPR and lipid monolayers experiments and that DRP1 showed increased affinity for the binding with CL, we could suggest that is not only the electrostatic component the responsible for this interaction. In addition, experiments performed by sucrose floating up showed that DRP1 was able to bind with similar capacity to CL-containing vesicles of different sizes, thus it suggest that DRP1 interaction with CL-containing liposomes is not affected by the intrinsic net curvature.

As previously was shown that other two dynamin-like proteins also interact with CL and that the region responsible for this interaction is localized in the region that corresponds to the B insert in DRP1, and also motivated by the fact that this B insert is localized in the same position of the PH domain of classic dynamins, which is responsible for the lipid-binding, we decided to analyze whether 4 lysines present in DRP1's B insert could play a role in this interaction. Mutation of 4 lysines to alanines reduced DRP1's capacity to bind to CL-containing membranes in SPR assays, a fact that confirms the implication of these 4 lysine residues located in the B insert in the interaction with CL.

Once the interaction was confirmed we wanted to further assess the possible functional implications that these interaction could carry in our protein. In this regard, we measured DRP1 GTPase activity in solution and in the presence of vesicles of different lipid compositions. We could only observe a significant increase in its GTPase activity in the presence of CL-containing liposomes. Furthermore, the mutant that was shown to be defective in the binding with CL did not show any increase in its activity upon incubation with CL-containing vesicles. These results demonstrate that CL is able to enhance DRP1 GTPase activity and that these 4 lysines participate in the lipid association and stimulation of the GTPase activity.

In the last part of the first chapter, we assessed whether the interaction with CL could lead to a conformational change of DRP1. After performing CD spectra and thermal denaturation assays we observed that the secondary structure was not modified in the presence of vesicles, in contrast interaction with CL-containing vesicles induced a conformational change in the tertiary structure of the protein leading to an increase in higher order protein stability. In addition, oligomerization assays performed by SEC demonstrated that interaction with CL is able to stimulate assembly of DRP1 into higher order oligomers.

In the second part of this work, we focused our attention in the obtention of recombinant BOK protein and elucidating its molecular mechanism of action. For this aim, we tried with multiple different constructs and conditions to express the protein. After big research effort was done, we finally could obtain the recombinant protein and described a detailed protocol for its purification (see Chapter 3.2). In addition, we also confirmed that the recombinant protein was properly folded, we described the best conditions for its stability and we also obtained crystal that unfortunately did not diffract.

Once the purification protocol for this protein was described we had the opportunity to characterize this protein *in vitro*. As it was known that multidomain BAX-type proteins are able to interact with CL, we wanted to assess whether this interaction could also be observed for BOK $\Delta$ C6His. Lipid dot-blot, sucrose floating up and monolayer experiments were performed and we observed with all these different techniques that BOK $\Delta$ C6His interacts and inserts in membranes enriched in the mitochondrion-specific lipid CL, as BAX and BAK do. However it seems that the ability that BOK possess to interact with CL is bigger than the one observed for the other two pro-apoptotic proteins. Here again, as in the case of DRP1 we could suggest that the interaction is not only due to electrostatic forces (interaction with other anionic phospholipids and the same net negative charge did not reproduce the one obtained with CL) and it seems that is not affected by the membrane intrinsic curvature (BOK $\Delta$ C6His binds similarly to CL-containing vesicles of different sizes). Leaving aside the small differences between BAX/BAK and BOK regarding the ability to bind CL, it looked like BOK $\Delta$ C6His was acting similarly to its sub-family members, thus we decided to examine whether BOK $\Delta$ C6His is able to permeabilize GUVs as BAX/BAK do. For this aim, GUVs were incubated with BOK $\Delta$ C6His in the presence of fluorescent dyes/proteins of different sizes. When GUVs were treated with BOK $\Delta$ C6His Alexa dye was incorporated into CL-rich but not into CL-less GUVs, in contrast no internalization was observed for APC. These results suggest that (i) BOK $\Delta$ C6His alone, without the need of other protein, such as BH3-only activator, is able to induce the internalization of small dyes in CL-containing GUVs, and (ii) BOK $\Delta$ C6His is not able to induce internalization of big dyes, suggesting that the protein forms a membrane permeability pathway of small size. These results argue against the hypothesis that BOK $\Delta$ C6His acts in a BAX/BAK-like manner. It is true that BAX/BAK are able to induce the internalization of dyes of different sizes, but they require the presence of a BH3-only activator, such as BID or BIM.

Once confirmed that BOK $\Delta$ C6His binds CL-containing vesicles, next step was to assess whether this interaction is able to induce a conformational change in protein structure. For this aim CD spectra and thermal denaturation assays were performed. The obtained results confirmed that

BOK $\Delta$ C6His secondary structure is not altered by the presence of vesicles, while the tertiary structure adopts a novel conformation in the presence of CL-containing vesicles.

In the last part of this thesis we attempted to gain further insights in BOK localization and function in cells. Until now there has been big controversy about the subcellular localization of BOK. For this reason we focus our attention to try to solve this issue. Subcellular fractionation assays and confocal microscopy analysis of GFP-BOK transfected cells showed that BOK could either be located at the mitochondria or at the ER. Interestingly, mitochondrial localization was altered in BAX/BAK DKO MEF cells, while ER localization was similar for all tested cellular lines. These results could suggest that BOK could require the presence of BAK to localize to the mitochondria, as it has been proposed recently for the case of BAX.

Another point that also generates big controversy is the capacity of BOK to induce cell death. After performing PS exposure measurements by FACS and cyt c release measurements by immunofluorescence of cells transfected with GFP-BOK and HA-BOK inducible cells, we could conclude that BOK is able to induce apoptosis either in presence or absence of BAX and BAK, as we observed PS exposure and cyt c release in BAX/BAK DKO cells and BAX/BAK containing cells.

However, in contrast to recent observations (Echeverry *et al.*, 2013), we found that BOK can induce apoptosis in MEF BAX<sup>-/-</sup>BAK<sup>-/-</sup> cells, even when its mitochondrial localization is drastically diminished in this cell type. These results indicate that BOK-induced apoptosis does not require the presence of BAX or/and BAK. In addition, we could also suggest that the small amount of mitochondrial BOK is able to induce this cell death or it could be also possible that BOK induces apoptosis through ER pathway.

We next wished to assess whether BOK could modulate mitochondrial morphology as observed for other BCL2 family proteins, such as BAX and BAK. We observed that cells overexpressing GFP-BOK or expressing HA-BOK show perinuclear clustering of mitochondria and also fragmented mitochondria along the cytoplasm. To try to analyse this phenomenon in more detail *in vitro* lipid-mixing assays were performed, which showed that BOK $\Delta$ C6His is able to induce lipid mixing in CL-containing liposomes in contrast to other BAX-like protein. These results argue again against the thought that BOK acts like BAX/BAK do. In addition to lipid-mixing assays, TEM and CryoEM experiments were carried out. By cryoEM big aggregates could be observed after incubation of CL-containing LUVs with BOK $\Delta$ C6His, in contrast such big aggregates could not be observed in the case of BAK and instead big pores could be observed when co-incubated with tBID.



In the last experiment carried out, we tried to identify putative BOK interacting partners via a co-immunoprecipitation of GFP-BOK of HEK 293T cells transfected with the protein of interest. Here, a great number of proteins that potentially could be interacting with BOK were identified, some of them arouse our interest. However these results are only preliminary results that need to be confirmed by other complementary techniques such as, immunoprecipitation assays with specific antibodies.

Although the obtained data provide us evidences for the mechanism of action of DRP1 and BOK proteins, there is still controversy in some issues that need to be further characterized. What remains to be determined is the underlying cause of the preferential interaction of DRP1 and BOK $\Delta$ C6His with CL. Several possibilities exist that are not mutually exclusive. Since CL contains a di-phosphate group as the polar headgroup it is conceivable that proteins may display a positively-charged region in their surface allowing recognition of this structural feature of CL. In addition, the highly unsaturated nature of the acyl chains of CL could also be implicated in the propensity of these proteins to interact with CL. It is also possible that CL favours the interaction with lipid membranes by producing specific changes in global lipid bilayer properties, such as altering membrane lipid lateral arrangement, membrane monolayer curvature, and membrane bending modulus.

Further studies are also required to determine the membrane topology adopted by BOK in CL-rich membranes. For this aim, fluorescence spectroscopy coupled to site-specific fluorescence labeling could be applied, since it is a powerful approach to identify membrane-interacting regions of proteins and for determining protein conformations and mechanisms that occur at the membrane level. In this approach, a single amino acid in a Cys-free protein is replaced with a Cys residue, and a fluorescent dye is then covalently attached to the sulfhydryl group of the newly introduced Cys. Spectral properties of fluorescently-labeled monocysteine protein are then determined before and after it binds to membranes. Many fluorescent dyes are sensitive to the presence of water, and their emission properties change substantially upon moving from an aqueous to a nonaqueous milieu. NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3,-diazolyl) could be chosen as the fluorescent probe because it is a relatively small and uncharged dye, and its N and O atoms give the dye sufficient polar character to be soluble in an aqueous environment. The last property is relevant because the dye should serve as a stable reporter group in both aqueous and nonaqueous environments. The dye should not be so hydrophobic that it buries itself in the bilayer irrespective of the conformation of the protein under study. Most importantly, NBD is environmentally sensitive and its spectral properties are dramatically different in aqueous and nonaqueous environments.

Another issue that remains to be determined is whether MOM-localized BAK may act as a receptor for BOK, as recently showed for the case of BAX. This point could be addressed by co-transfecting together GFP-BOK and GFP-BAK in BAX/BAK DKO MEF cells and see whether the presence of BAK restores the mitochondrial localization of GFP-BOK observed in cells that endogenously express BAK. Another way to assess these same question could be by transfection GFP-BOK in cells where BAK has been silenced and observed whether the lack of BAK influences BOK mitochondrial localization.

Another question that still needs an answer is how could MOM- or ER-localized BOK induce cytochrome c release independently of BAX/BAK. As in the absence of BAX and BAK only a small pool of BOK protein is localized to the MOM, it implies that BOK could induce cytochrome c release indirectly through the ER. We could treat GFP-BOK transfected BAX/BAK DKO MEF cells with an ER stress inducing factor and observed whether under these conditions cells are positive in PS exposure by FACS or release cytochrome c by confocal microscopy. We could also analyse whether the mere overexpression of GFP-BOK is able to regulate the  $Ca^{2+}$  release from the ER that could then lead to accumulation of  $Ca^{2+}$  in the mitochondria and consequently cell death. Other alternative could be that BOK is able to porate the MOM on its own. To examine this hypothesis permeabilization assays with recombinant protein and LUVs could be performed. A common experimental approach using model systems to study the bilayer perturbations generated by membrane active peptides and proteins relies on the measurement of the fluorescence changes of vesicle-encapsulated fluorescent probes. ANTS/DPX release experiments could be carried out, in this assay, the fluorescent probe ANTS (8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid sodium salt) and its quencher DPX (p-xylenebis(pyridinium)bromide) are co-encapsulated in the aqueous compartment of the liposomes. By entrapping both ANTS and DPX inside the vesicles, their close proximity allows DPX to quench ANTS fluorescence by collision. Upon addition of a membrane-perturbing agent, both molecules “leak out” and are diluted into the external medium where they hardly interact, inducing an increase of ANTS fluorescence. Thus, by monitoring ANTS fluorescence, vesicle bilayer permeabilization, can be followed in time. However, we have already performed internalization assays with GUVs and the results obtained suggested that BOK is only able to induce internalization of small dyes. Furthermore, CryoEM results also argue for a model where BOK does not form pores, contrary to the observation done with BAK.

The last important point that should be addressed by future work is the molecular mechanism by which BOK induces mitochondrial morphological changes. Until now, BOK membrane remodelling activity appears to be DRP1-independent, but it could be possible that BOK may modulate mitochondrial dynamics by interacting with other fusion/fission regulating protein, such as mitofusins, as previously proposed for BAK. Although MFN1 neither MFN2 co-IP with GFP-BOK in our GFP-trap IP assay, this does not exclude the possibility of an unstable interaction.

Moreover, as the possibility that BOK alone could directly remodel the mitochondrial membrane structure seems to be less probable. I would suggest to assess the capacity that BOK possess to induce these morphological changes in mitofusin knockout cells, to confirm whether BOK membrane remodelling activity is mitofusin-dependent or not.

All this unanswered questions require to be further examined by additional experimental approaches and these are our future goals to try to clear up the molecular mechanisms by which BOK and DRP1 proteins act at the membrane level.

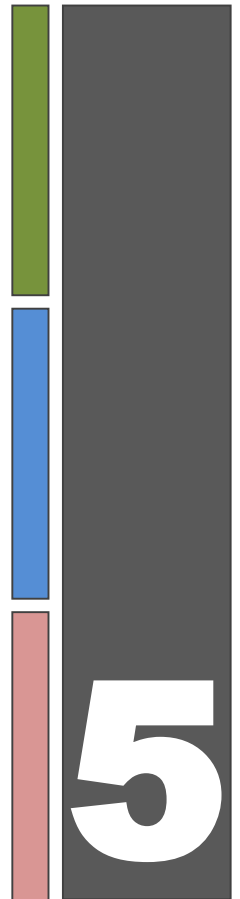
# CONCLUSIONS

The specific conclusions of this Thesis are:

1. Recombinant DRP1 binds to model membranes containing the mitochondrion-specific lipid CL through a module of four lysines located in the B insert of the protein. Interaction with CL stimulates DRP1 oligomerization and GTPase activity *in vitro*, suggesting CL could be an important physiological regulator of DRP1's activity.
2. It is possible to obtain a purified recombinant version of BOK lacking its last 24 C-terminal amino acids and containing an N-terminal hexahistidine tag (BOK $\Delta$ C6His) that can be used as a promising tool for gaining mechanistic and structural information about the physiological mode of BOK action.
3. BOK $\Delta$ C6His interacts with and inserts into CL-rich model membranes. The BOK $\Delta$ C6His:CL interaction unleashes an intrinsic membrane-permeabilizing activity of the protein and produces localized changes in its structure. No evidence supports that BH3-only proteins regulate BOK functional activation, unlike the case of BAK and BAX.
4. Ectopically expressed GFP-BOK localizes to and is partially inserted into mitochondrial and ER membranes. BOK overexpression triggers: (i) MOMP through a mechanism that remains to be elucidated; and (ii) changes in normal mitochondrial morphology through a DRP1-independent mechanism. Co-immunoprecipitation assays identified several BOK interaction partners of potential interest that await further validation.

# CHAPTER 5:

# REFERENCES





## 5. REFERENCES

Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.

Aisenbrey, C., Michalek, M., Salnikov, E.S., and Bechinger, B. (2013). Solid-State NMR Approaches to Study Protein Structure and Protein–Lipid Interactions. In *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, pp. 357–387.

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, a, Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya S and Wissinger B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211–215.

Alphonse, G., Aloy, M.T., Broquet, P., Gerard, J.P., Louisot, P., Rousson, R., and Rodriguez-Lafrasse, C. (2002). Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 821–835.

Ambroggio, E.E., Kim, D.H., Separovic, F., Barrow, C.J., Barnham, K.J., Bagatolli, L.A., and Fidelio, G.D. (2005a). Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide. *Biophys. J.* 88, 2706–2713.

Ambroggio, E.E., Separovic, F., Bowie, J.H., Fidelio, G.D., and Bagatolli, L. a (2005b). Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophys. J.* 89, 1874–1881.

Ananthanarayanan, B., Stahelin, R. V, Digman, M.A., and Cho, W. (2003). Activation Mechanisms of Conventional Protein Kinase C Isoforms Are Determined by the Ligand Affinity and Conformational Flexibility of Their C1 Domains. *J. Biol. Chem.* 278, 46886–46894.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell B., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R and Young I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290.

Angelova, M.I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J.F., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields . Kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89, 127–131.

Annis, M.G., Soucie, E.L., Dlugosz, P.J., Cruz-Aguado, J. a, Penn, L.Z., Leber, B., and Andrews, D.W. (2005). Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J.* 24, 2096–2103.

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 271–278.

- Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., and Hardwick, J.M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends Cell Biol.* *23*, 103–111.
- Apellaniz, B., Nieva, J.L., Schwille, P., and García-Saez, A. (2010). All-or-None versus Graded : Single-Vesicle Analysis Reveals Lipid Composition Effects on Membrane Permeabilization. *Biophys. J.* *99*, 3619–3628.
- Ardail, D., Privat, J.P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., and Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* *265*, 18797–18802.
- Arnarez, C., Mazat, J.P., Elezgaray, J., Marrink, S.J., and Periole, X. (2013a). Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc1. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 3112–3120.
- Arnarez, C., Marrink, S.J., and Periole, X. (2013b). Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels. *Sci. Rep.* *3*, 1263.
- Arnoult, D. (2007). Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* *17*, 6–12.
- Arnoult, D. (2008). Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. *Methods* *44*, 229–234.
- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.-C., Antonsson, B., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J. Cell Biol.* *159*, 923–929.
- Autret, A., and Martin, S.J. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol. Cell* *36*, 355–363.
- Babahosseini, H., Roberts, P., Schmelz, E., and Agah, M. (2012). Roles of bioactive sphingolipid metabolites in ovarian cancer cell biomechanics. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2436–2439.
- Bacia, K., Futai, E., Prinz, S., Meister, A., Daum, S., Glatte, D., Briggs, J.A.G., and Schekman, R. (2011). Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes. *Sci. Rep.* *1*, 1–6.
- Baggetto, L.G., Clottes, E., and Vial, C. (1992). Low Mitochondrial Proton Leak Due to High Membrane Cholesterol Content and Cytosolic Creatine Kinase as Two Features of the Deviant Bioenergetics of Ehrlich and AS30-D Tumor Cells. *Cancer Res.* *52*, 4935–4941.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn II, G.W., Robbins J. and Molkenin J.D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in ceel death. *Nature* *434*, 658–662.
- Baines, C.P., Kaiser, R. a, Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkenin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* *9*, 550–555.
- Bajaj, R., Munari, F., Becker, S., and Zweckstetter, M. (2014). Interaction of the intermembrane space domain of Tim23 with mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.* 0–11.



Bakhshi, a, Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, a L., and Korsmeyer, S.J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* *41*, 899–906.

Bakrač, B., Gutiérrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A.F.P., Gilbert, R.J.C., Maček, P., Lakey, J.H., and Anderluh, G. (2008). Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.* *283*, 18665–18677.

Ban, T., Heymann, J. a W., Song, Z., Hinshaw, J.E., and Chan, D.C. (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2113–2122.

Barth, P.G., Scholte, H.R., Berden, J.A., Van der Klei-Van Moorsel, J.M., Luyt-Houwen, I.E., Van 't Veer-Korthof, E.T., Van der Harten, J.J., and Sobotka-Plojhar, M.A. (1983). An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes.

Barth, P.G., Valianpour, F., Bowen, V.M., Lam, J., and Duran, M. (2004). X-Linked Cardioskeletal Myopathy and Neutropenia ( Barth Syndrome ): An Update. *Am. J. Med. Genet.* *126A*, 349–354.

Bartholomeusz, G., Wu, Y., Seyed, M.A., Xia, W., Kwong, K.Y., Hortobagyi, G., and Hung, M.C. (2006). Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Mol. Carcinog.* *45*, 73–83.

Bartlett, G.R. (1959). Colorimetric Assay Methods for Free and Phosphorylated Glyceric Acids. *J. Biol. Chem.* *234*, 469–471.

Basañez, G., and Hardwick, J.M. (2008). Unravelling the Bcl-2 Apoptosis Code with a Simple Model System. *Plos* *6*, 1148–1151.

Basañez, G., Nechushtan, a, Drozhinin, O., Chanturiya, a, Choe, E., Tutt, S., Wood, K. a, Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R.J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5492–5497.

Basañez, G., Zhang, J., Chau, B.N., Makshev, G.I., Frolov, V.A., Brandt, T.A., Burch, J., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2001). Pro-apoptotic Cleavage Products of Bcl-x L Form Cytochrome c -conducting Pores in Pure Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.* *276*, 31083–31091.

Basañez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., and Zimmerberg, J. (2002). Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.* *277*, 49360–49365.

Basañez, G., Soane, L., and Hardwick, J.M. (2012). A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS Biol.* *10*, e1001399.

Bazán, S., Mileykovskaya, E., Mallampalli, V.K.P.S., Heacock, P., Sparagna, G.C., and Dowhan, W. (2013). Cardiolipin-dependent Reconstitution of Respiratory Supercomplexes from Purified *Saccharomyces cerevisiae* Complexes III and IV \*. *J. Biol. Chem.* *288*, 401–411.

Bellare, J.R., Davis, H.T., Scriven, L.E., and Talmon, Y. (1988). Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique. *J. Electron Microsc. Tech.* *10*, 87–111.

- Beranek, A., Rechberger, G., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Leber, R., and Knauer, H. (2009). Identification of a Cardiolipin-specific Phospholipase Encoded by the Gene CLD1 ( YGR110W ) in Yeast \*. *J. Biol. Chem.* *1*, 11572–11578.
- Berman, S.B., Chen, Y., Qi, B., McCaffery, J.M., Rucker, E.B., Goebbels, S., Nave, K.-A., Arnold, B. a, Jonas, E. a, Pineda, F.J. and Hardwick M. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J. Cell Biol.* *184*, 707–719.
- Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., Henry, K.T.M., Pinchback R.D., Ligon A.Z., Cho Y-J., Haery L., Greulich H., Reich M., Winckler W., Lawrence M.S., Weir B.A., Tanaka K.E., Chiang D.Y., Bass A.J., Loo A., Hoffman C., Prensner J., Liefeld T., Gao Q., Yecies D:, Signoretti S., Maher E., Kaye F.J., Sasaki H., Tepper J.E., Fletcher J.A., Tabernero J., Baselga J., Tsao M-S., DeMichelis F., Rubin M.A., Janne P.A., Nucera D.C., Levine R.L., Ebert B.L., Gabriel S., Rustgi A.K., Antinsecu C.R., Ladanyil M., Letal A., Garraway L.A., Loda M., Beer D.G., True L.D., Okamoto A., Pomeroy S.L., Singer S., Golub T.R., Lander E.S, Getz G., Sellers W.R. and Meyerson M. (2010). The landscape of somatic copy-number alterations across human cancers. *Nature* *463*, 899–905.
- Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J.H., and Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein – membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* *141*, 169–178.
- Beverly, L.J., Howell, L. a, Hernandez-Corbacho, M., Casson, L., Chipuk, J.E., and Siskind, L.J. (2013). BAK activation is necessary and sufficient to drive ceramide synthase-dependent ceramide accumulation following inhibition of BCL2-like proteins. *Biochem. J.* *452*, 111–119.
- Bevens, E.M., and Williamson, P.L. (2010). Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.* *584*, 2724–2730.
- Beyer, K., and Klingenberg, M. (1985). ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* *24*, 3821–3826.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* *6*, e147.
- Birbes, H., El Bawab, S., Obeid, L.M., and Hannun, Y. a (2002). Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv. Enzyme Regul.* *42*, 113–129.
- Birbes, H., Luberto, C., Hsu, Y.-T., El Bawab, S., Hannun, Y. a, and Obeid, L.M. (2005). A mitochondrial pool of sphingomyelin is involved in TNFalpha-induced Bax translocation to mitochondria. *Biochem. J.* *386*, 445–451.
- Bleicken, S., Classen, M., Padmavathi, P.V.L., Ishikawa, T., Zeth, K., Steinhoff, H.-J., and Bordignon, E. (2010). Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J. Biol. Chem.* *285*, 6636–6647.
- Bleicken, S., Wagner, C., and García-Sáez, A.J. (2013a). Mechanistic Differences in the Membrane Activity of Bax and Bcl-xL Correlate with Their Opposing Roles in Apoptosis. *Biophys. J.* *104*, 421–431.

- Bleicken, S., Landeta, O., Landajueta, A., Basañez, G., and García-Sáez, A.J. (2013b). Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J. Biol. Chem.* *288*, 33241–33252.
- Bogner, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2010). Apoptosis: embedded in membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 845–851.
- Boldogh, I.R., and Pon, L. a (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* *17*, 502–510.
- Boite, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light. *J. Microsc.* *224*, 213–232.
- Bossy-wetzels, B.E., and Green, D.R. (2000). *Assays for Cytochrome c Release from Mitochondria during Apoptosis* (ACADEMIC PRESS).
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* *348*, 125–132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117–127.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brandner, K., Mick, D.U., Frazier, A.E., Taylor, R.D., Meisinger, C., and Rehling, P. (2005). Taz1 , an Outer Mitochondrial Membrane Protein , Affects Stability and Assembly of Inner Membrane Protein Complexes : Implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5202–5214.
- Braschi, E., Zunino, R., and McBride, H.M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep.* *10*, 748–754.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* *22*, 8608–8618.
- De Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605–610.
- Brockman, H. (1999). Lipid monolayers : why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 438–443.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J., and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11649–11654.
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G. V, Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol. Cell* *55*, 938–946.
- Brown, C.Y., Bowers, S.J., Loring, G., Heberden, C., Lee, R.-M., and Neiman, P.E. (2004). Role of Mtd/Bok in normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* *28*, 619–634.

- Brymora, A., Valova, V.A., and Robinson, P.J. (2004). Protein-Protein Interactions Identified by Pull-Down Experiments and Mass Spectrometry. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 1–51.
- Bui, H.T., Karren, M. a, Bhar, D., and Shaw, J.M. (2012). A novel motif in the yeast mitochondrial dynamin Dnm1 is essential for adaptor binding and membrane recruitment. *J. Cell Biol.* 199, 613–622.
- Bustillo-Zabalbeitia, I., Montessuit, S., Raemy, E., Basañez, G., Terrones, O., and Martinou, J.-C. (2014). Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* 9, e102738.
- Cartoni, R., Arnaud, E., Médard, J.-J., Poirot, O., Courvoisier, D.S., Chrast, R., and Martinou, J.-C. (2010). Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* 133, 1460–1469.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, a, Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15803–15808.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. a, and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.
- Cervený, K.L., and Jensen, R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p Interact with Dnm1p and Fis1p to Regulate Division of Mitochondria □. *Mol. Biol. Cell* 14, 4126–4139.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Article Yeast Mitochondrial Division and Distribution Require the Cortical Num1 Protein. *Dev. Cell* 12, 363–375.
- Chan, D.C. (2006a). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* 125, 1241–1252.
- Chan, D.C. (2006b). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99.
- Chang, C.-R., and Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial. *J. Biol. Chem.* 282, 21583–21587.
- Chang, C.-R., and Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 34–39.
- Chang, S., Heacock, P.N., Mileykovskaya, E., Voelker, D.R., and Dowhan, W. (1998). Isolation and Characterization of the Gene *Saccharomyces cerevisiae* Isolation and Characterization of the Gene ( *CLS1* ) Encoding Cardiolipin Synthase in *Saccharomyces cerevisiae* \*. *J. Biol. Chem.* 14933–14941.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin’s assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465, 435–440.
- Chen, D., Zhang, X., and Shi, Y. (2006). Identification and functional characterization of hCLS1 , a human cardiolipin synthase localized in mitochondria. *Biochem. J.* 176, 169–176.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* *17*, 393–403.

Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R. a, Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *8*, 705–711.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* *37*, 299–310.

Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* *148*, 988–1000.

Cho, D., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-Nitrosylation of Drp1 Mediates  $\beta$ -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* (80-. ). *324*, 102–105.

Choi, S., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1255–1262.

Chu, C.T., Ji, J., Dagda, R.K., Jiang, J.F., Tyurina, Y.Y., Kapralov, A. a, Tyurin, V. a, Yanamala, N., Shrivastava, I.H., Mohammadyani, D., Qiang Wang K.Z., Zhu J., Klein-Seetharaman J., Balasubramanian K., Amoscato A.A., Borisenko G., Huang Z., Gusdon A.M., Cheikhi A., Steer E.K., Wang R., Baty C., Watkins S., Bayir H. and Kagan V.E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1197–1205.

Chung, K.W., Kim, S.B., Park, K.D., Choi, K.G., Lee, J.H., Eun, H.W., Suh, J.S., Hwang, J.H., Kim, W.K., Seo, B.C., Kim S.H., Son I.H., Kim S.M., Sunwoo I.N. and Cho B.O. (2006). Early onset severe and late-onset mild Charcot – Marie – Tooth disease with mitofusin 2 ( MFN2 ) mutations. *Brain* *129*, 2103–2118.

Claypool, S.M. (2009). Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 2059–2068.

Claypool, S.M., and Koehler, C.M. (2012). The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 32–41.

Claypool, S.M., Oktay, Y., Boontheung, P., Loo, J.A., and Koehler, C.M. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the mayor ADP/ATP carrier protein of the mitochondria inner membrane. *J. Cell Biol.* *182*, 937–950.

- Clem, R.J., Cheng, E.H., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahashi, a, Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veliuona, M. and Hardwick M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 554–559.
- Cocklin, S., Jost, M., Robertson, N.M., Weeks, S.D., Weber, H.W., Young, E., Seal, S., Zhang, C., Mosser, E., Loll, P.J., Saunders A.J., Rest R.F and Chaiken I.M. (2006). Real-time monitoring of the membrane-binding and insertion properties of the cholesterol-dependent cytolysin anthrolysin O from *Bacillus anthracis*. In *Journal of Molecular Recognition*, pp. 354–362.
- Colell, a, García-Ruiz, C., Roman, J., Ballesta, a, and Fernández-Checa, J.C. (2001). Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway. *FASEB J.* *15*, 1068–1070.
- Colell, A., García-Ruiz, C., Lluís, J.M., Coll, O., Mari, M., and Fernández-Checa, J.C. (2003). Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J. Biol. Chem.* *278*, 33928–33935.
- Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C.S., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H., and Kumar, S. (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery. *J. Cell Biol.* *148*, 703–714.
- Contreras, F., Ernst, A.M., Wieland, F., and Brügger, B. (2011). Specificity of Intramembrane Protein – Lipid Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Contreras, F.-X., Ernst, A.M., Haberkant, P., Björkholm, P., Lindahl, E., Gönen, B., Tischer, C., Elofsson, A., von Heijne, G., Thiele, C., Pepperkok R., Wielan F. and Brügger B. (2012). Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein’s transmembrane domain. *Nature* *481*, 525–529.
- Crain, R.C., Clark, R.W., and Harvey, B.E. (1983). Role of Lipid Transfer Proteins in the Abnormal Lipid Content of Morris Hepatoma Mitochondria and Microsomes. *Cancer Res.* *43*, 3197–3202.
- Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* *8*, 939–944.
- Crimi, M., and Esposti, M.D. (2011). Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 551–557.
- Cuddeback, S.M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H.G. (2001). Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.* *276*, 20559–20565.
- Cullis, P.R., and De Kruijff, B. (1979). LIPID POLYMORPHISM AND THE FUNCTIONAL ROLES OF LIPIDS IN BIOLOGICAL MEMBRANES. *Biochim. Biophys. Acta* *559*, 399–420.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., Thompson, G. V, Wardak, A.Z., Fairlie, W.D., and Colman, P.M. (2011). Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.* *286*, 7123–7131.

- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., Huang D.C.S., Kluck R.M., Adams J.M. and Colman P.M. (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* *152*, 519–531.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Dai, H., Smith, A., Meng, X.W., Schneider, P. a, Pang, Y.-P., and Kaufmann, S.H. (2011). Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J. Cell Biol.* *194*, 39–48.
- Danial, N.N. (2009). BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* *27 Suppl 1*, S53–S70.
- Danial, N., and Korsmeyer, S. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205–219.
- Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., and Ferri, K.F. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* *14*, 729–739.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S.J., Antonsson, B., Jonas, E.A. and Kinnally K.W. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2424–2432.
- Dejean, L.M., Ryu, S.-Y., Martinez-Caballero, S., Teijido, O., Peixoto, P.M., and Kinnally, K.W. (2010). MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 1231–1238.
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J., and Martin, S.J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol. Cell* *21*, 761–773.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., and Guo, M. (2008a). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14503–14508.
- Deng, X., Yin, X., Allan, R., Lu, D.D., Maurer, C.W., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Shaham, S., and Kolesnick, R. (2008b). Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science* *322*, 110–115.
- Desagher, S., and Martinou, J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* *10*, 369–377.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* *144*, 891–901.
- DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H., and Nunnari, J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* *186*, 793–803.

Dewson, G., and Kluck, R.M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell Sci.* *122*, 2801–2808.

Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To Trigger Apoptosis, Bak Exposes Its BH3 Domain and Homodimerizes via BH3 : Groove Interactions. *Mol. Cell* *30*, 369–380.

Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak Activation for Apoptosis Involves Oligomerization of Dimers via Their a 6 Helices. *Mol. Cell* *36*, 696–703.

Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* *19*, 661–670.

Diaz, F., and Moraes, C.T. (2008). Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* *44*, 24–35.

Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* *25*, 2287–2296.

Dorn, G.W., and Maack, C. (2013). SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *55*, 42–49.

Duchen, M.R. (2000). Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* *28*, 339–348.

Duchen, M.R. (2004). Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* *25*, 365–451.

Duchen, M.R., Verkhatsky, A., and Muallem, S. (2008). Mitochondria and calcium in health and disease. *Cell Calcium* *44*, 1–5.

Dumitru, R., Gama, V., Fagan, B.M., Bower, J.J., Swahari, V., Pevny, L.H., and Deshmukh, M. (2012). Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Mol. Cell* *46*, 573–583.

Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, a, Simon, H.U., and Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ.* *20*, 785–799.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* *145*, 104–116.

Edwards, A.L., Gavathiotis, E., LaBelle, J.L., Braun, C.R., Opoku-Nsiah, K. a, Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem. Biol.* *20*, 888–902.

Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M.T., and Palmer, C.S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 150–161.



Elliott, M.R., and Ravichandran, K.S. (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* *189*, 1059–1070.

Eband, R.F., Martinou, J.-C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D.W., and Eband, R.M. (2002). The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J. Biol. Chem.* *277*, 32632–32639.

Eband, R.F., Martinou, J.-C., Montessuit, S., and Eband, R.M. (2003). Transbilayer lipid diffusion promoted by Bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* *42*, 14576–14582.

Eband, R.F., Schlattner, U., Wallimann, T., Lacombe, M.-L., and Eband, R.M. (2007). Novel lipid transfer property of two mitochondrial proteins that bridge the inner and outer membranes. *Biophys. J.* *92*, 126–137.

Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* *357*, 289–298.

Escobar-henriques, M., Westermann, B., and Langer, T. (2006). Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J. Cell Biol.* *173*, 645–650.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 929–935.

Esposti, M.D., Erler, J.T., Hickman, J.A., and Dive, C. (2001). Bid , a Widely Expressed Proapoptotic Protein of the Bcl-2 Family , Displays Lipid Transfer Activity. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7268–7276.

Esposti, M.D., Cristea, I.M., Gaskell, S.J., Nakao, Y., and Dive, C. (2003). Proapoptotic Bid binds to monolysocardiolipin, a new molecular connection between mitochondrial membranes and cell death. *Cell Death Differ.* *10*, 1300–1309.

Estes, D.J., and Mayer, M. (2005). Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochim. Biophys. Acta* *1712*, 152–160.

Ettxebarria, A., Landeta, O., Antonsson, B., and Basañez, G. (2008). Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from in vitro reconstituted systems. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 1563–1576.

Ettxebarria, A., Terrones, O., Yamaguchi, H., Landajueta, A., Landeta, O., Antonsson, B., Wang, H.-G., and Basañez, G. (2009). Endophilin B1/Bif-1 stimulates BAX activation independently from its capacity to produce large scale membrane morphological rearrangements. *J. Biol. Chem.* *284*, 4200–4212.

Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin ( Mfn ) protein function. *J. Cell Sci.* *119*, 4913–4925.

Fannjiang, Y., Kim, C., Haganir, R.L., Zou, S., Lindsten, T., Thompson, C.B., Mito, T., Traystman, R.J., Larsen, T., Griffin, D.E., Mandir A.S., Dawson T.D, Dike S., Sappingnton A.L., Kerr D.A., Jonas

- A.L., Kaczmarek L.K. and Hardwick M. (2003). BAK alters Neuronal excitability and Can Switch from Anti- to Pro-Death Function during Postnatal Development. *Dev. Cell* 4, 575–585.
- Feng, Y., Lin, Z., Shen, X., Chen, K., Jiang, H., and Liu, D. (2008). Bcl-xL forms two distinct homodimers at non-ionic detergents: implications in the dimerization of Bcl-2 family proteins. *J. Biochem.* 143, 243–252.
- Feo, F., Canuto, R. a, Bertone, G., Garcea, R., and Pani, P. (1973). Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from morris hepatoma 5123 and rat liver. *FEBS Lett.* 33, 229–232.
- Figuroa-Romero, C., Iñiguez-Lluhí, J. a, Stadler, J., Chang, C.-R., Arnoult, D., Keller, P.J., Hong, Y., Blackstone, C., and Feldman, E.L. (2009). SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *FASEB J.* 23, 3917–3927.
- Fiske, C.H., and Subbarow, Y. (1925). THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400.
- Fleischer, S., Rouser, G., Fleischer, B., Casu, a, and Kritchevsky, G. (1967). Lipid composition of mitochondria from bovine heart, liver, and kidney. *J. Lipid Res.* 8, 170–180.
- Fletcher, J.I., Meusburger, S., Hawkins, C.J., Ri-, D.T., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Huang, D.C.S., and Adams, J.M. (2008). Corrections for “ Inaugural Article : Apoptosis is triggered when vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18081–18087.
- Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I., and Viola, A.M. (2004). Mutation in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.* 13, 923–934.
- Ford, M.G.J., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J.K., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361–366.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.
- Frederik, P.M., and Hubert, D.H.W. (2005). Cryoelectron microscopy of liposomes. *Methods Enzymol.* 391, 431–448.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V, Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177–189.
- Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation : functional mitochondria from mouse liver , muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 287–295.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.

Fröhlich, C., Grabiger, S., Schwefel, D., Faelber, K., Rosenbaum, E., Mears, J., Rocks, O., and Daumke, O. (2013). Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J.* *32*, 1280–1292.

Fry, M., and Green, D.E. (1981). Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* *256*, 1874–1880.

Fuertes, G., García-Sáez, A.J., Esteban-Martín, S., Giménez, D., Sánchez-Muñoz, O.L., Schwille, P., and Salgado, J. (2010a). Pores formed by Bax $\alpha$ 5 relax to a smaller size and keep at equilibrium. *Biophys. J.* *99*, 2917–2925.

Fuertes, G., Giménez, D., Martín, S.E., Sáez, A.J.G., Sánchez, O., and Salgado, J. (2010b). Chapter 4. In *Proteins: Membrane Binding and Pore Formation*, pp. 31–55.

Fuertes, G., García-Sáez, A.J., Esteban-Martín, S., Giménez, D., Sánchez-Muñoz, O.L., Schwille, P., and Salgado, J. (2010c). Pores Formed by Bax  $\alpha$  5 Relax to a Smaller Size and Keep at Equilibrium. *Biophys. J.* *99*, 2917–2925.

Fuertes, G., Giménez, D., Esteban-Martín, S., Sánchez-Muñoz, O.L., and Salgado, J. (2011). A lipocentric view of peptide-induced pores. *Eur. Biophys. J.* *40*, 399–415.

Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *93*, 97–102.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* *25*, 4798–4811.

Ganesan, V., and Colombini, M. (2010). Regulation of ceramide channels by Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett.* *584*, 2128–2134.

Ganesan, V., Perera, M.N., Colombini, D., Datskovskiy, D., Chadha, K., and Colombini, M. (2010). Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis* *15*, 553–562.

Gao, S., Fu, W., Dürrenberger, M., De Geyter, C., and Zhang, H. (2005). Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 1015–1024.

García-Pacios, M., Collado, M.I., Busto, J. V., Sot, J., Alonso, A., Arrondo, J.L.R., and Goñi, F.M. (2009). Sphingosine-1-phosphate as an amphipathic metabolite: Its properties in aqueous and membrane environments. *Biophys. J.* *97*, 1398–1407.

García-Ruiz, C., Mari, M., Colell, a, Morales, a, Caballero, F., Montero, J., Terrones, O., Basañez, G., and Fernández-Checa, J.C. (2009). Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol. Histopathol.* *24*, 117–132.

García-Sáez, a J. (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* *19*, 1733–1740.

García-Sáez, A.J., Mingarro, I., Pérez-Payá, E., and Salgado, J. (2004). Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* *43*, 10930–10943.

- García-Sáez, A.J., Coraiola, M., Dalla Serra, M., Mingarro, I., Menestrina, G., and Salgado, J. (2005). Peptides derived from apoptotic Bax and Bid reproduce the poration activity of the parent full-length proteins. *Biophys. J.* *88*, 3976–3990.
- García-Sáez, A.J., Coraiola, M., Serra, M.D., Mingarro, I., Müller, P., and Salgado, J. (2006). Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J.* *273*, 971–981.
- García-Sáez, A.J., Ries, J., Orzáez, M., Pérez-Payà, E., and Schwille, P. (2009). Membrane promotes tBID interaction with BCL(XL). *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1178–1185.
- Garofalo, T., Giammarioli, a M., Misasi, R., Tinari, a, Manganelli, V., Gambardella, L., Pavan, a, Malorni, W., and Sorice, M. (2005). Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.* *12*, 1378–1389.
- Gavathiotis, E., and Walensky, L.D. (2011). Tracking BAX once its trigger is pulled. *Cell Cycle* *10*, 868–870.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N. and Walensky L.D. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* *455*, 1076–1081.
- Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Davis, M.L., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2010). BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol. Cell* *40*, 481–492.
- Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Bellairs, J. a, Leshchiner, E.S., and Walensky, L.D. (2012). Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 639–645.
- Gawłowski, T., Suarez, J., Scott, B., Torres-Gonzalez, M., Wang, H., Schwappacher, R., Han, X., Yates, J.R., Hoshijima, M., and Dillmann, W. (2012). Modulation of dynamin-related protein 1 (DRP1) function by increased O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine modification (O-GlcNAc) in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *287*, 30024–30034.
- Gebert, N., Joshi, A.S., Kutik, S., Becker, T., McKenzie, M., Guan, X.L., Mooga, V.P., Stroud, D. a, Kulkarni, G., Wenk, M.R., Rehling P., Meisinger C., Ryan M.T., Wiedermann N., Greenberg M.L. and Pfanner N. (2009). Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr. Biol.* *19*, 2133–2139.
- George, N.M., Evans, J.J.D., and Luo, X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* *21*, 1937–1948.
- George, N.M., Targy, N., Evans, J.J.D., Zhang, L., and Luo, X. (2010). Bax contains two functional mitochondrial targeting sequences and translocates to mitochondria in a conformational change- and homo-oligomerization-driven process. *J. Biol. Chem.* *285*, 1384–1392.
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., and Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1817–1827.

Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., Lippe G. and Bernardi P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5887–5892.

Gohil, V.M., Hayes, P., Matsuyama, S., Schägger, H., Schlame, M., and Greenberg, M.L. (2004). Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J. Biol. Chem.* *279*, 42612–42618.

Gonzalvez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E.D., Brooks, D.G., Wanders, R.J. a, Petit, P.X., Vaz, F.M., and Gottlieb, E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.* *183*, 681–696.

Gonzalvez, F., Pariselli, F., Jalmar, O., Dupaigne, P., Sureau, F., Dellinger, M., Hendrickson, E. a, Bernard, S., and Petit, P.X. (2010). Mechanistic issues of the interaction of the hairpin-forming domain of tBid with mitochondrial cardiolipin. *PLoS One* *5*, e9342.

Gonzalvez, F., D'Aurelio, M., Boutant, M., Moustapha, A., Puech, J.-P., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Vial, G., Taleux, N., Slomianny, C., Wanders R.J., Houtkooper R.H., Bellenguer P., Moller I.M., Gottlieb E., Vaz F.M., Manfredi G. and Petit P.X. (2013). Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 1194–1206.

Graham, J.M., and Green, C. (1970). The properties of mitochondria enriched in vitro with cholesterol. *Eur. J. Biochem.* *12*, 58–66.

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming J., Dhe-Paganon S., Park H-W., Savchenko A., Yee A., Edwards A., Vincentelli R., Cambillau C., kim R., Kim S-H., Rao Z., Shi Y., Terwilliger T.C., Kim C-Y., Hung L-W., Waldo G.S., Peleg Y., Albeck S., Unger T., Dym O., Prilusky J., Sussman J.L., Stevens R.C., Lesley S.A., Wilson I.A., Joachimiak A., Collart F., Dementieva I., Donnelly M.I., Eschenfeldt W.H., Kim Y., Stols L., Wu R., Zhou M., Burley S.K., Emtage J.S., Sauder J.M., Thompson D., Bain K., Luz J., Gheyi T., Zhang F., Atwell S., Almo S.C., Bonanno J.B., Fiser A., Swaminathan S., Studier F.W., Chance M.R., Sali A., Acton T.B., Xiao R., Ma L.C., Hunt J.F., Tong L., Cunningham K. Inouye M., Anderson S., Janjua H., Shastry R., Ho C.K., Wang D., Wang H., Jiang M., Montelione G.T., Stuart D.I., Owens R.J., Daenke S., Schütz A., Heinemann U., Yokoyama S. and Büssov K. (2008). Protein production and purification. *Nat. Methods* *5*, 135–146.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* (80-. ). *305*, 626–629.

Greenfield, N.J. (2009). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Protoc.* *1*, 2527–2535.

Griffin, E.E., Detmer, S. a, and Chan, D.C. (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 482–489.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N. a, Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J. a (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* *144*, 903–914.

Griparic, L., and Blik, A.M. Van Der (2001). The Many Shapes of Mitochondrial Membranes. *Traffic* 2, 235–244.

Griparic, L., Wel, N.N. Van Der, Ian, J., Peters, P.J., Van, A.M., Orozco, I.J., and Blik, A.M. Van Der (2004). Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1 / OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792–18798.

Griparic, L., Kanazawa, T., and Blik, A.M. Van Der (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* 178, 757–764.

Gu, Z., Valianpour, F., Chen, S., Vaz, F.M., Hakkaart, G.A., Wanders, R.J.A., and Greenberg, M.L. (2004). Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast *taz1* mutant : a model for Barth syndrome. *Mol. Microbiol.* 51, 149–158.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* 100, 315–325.

Guo, C., Hildick, K.L., Luo, J., Dearden, L., Wilkinson, K. a, and Henley, J.M. (2013). SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J.* 32, 1514–1528.

Haberkant, P., Schmitt, O., Contreras, F.-X., Thiele, C., Hanada, K., Sprong, H., Reinhard, C., Wieland, F.T., and Brügger, B. (2008). Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *J. Lipid Res.* 49, 251–262.

Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 30, 269–297.

Hájek, P., Chomyn, A., and Attardi, G. (2007). Identification of a Novel Mitochondrial Complex Containing Mitofusin 2 and Stomatin-like Protein 2 \*. *J. Biol. Chem.* 282, 5670–5681.

Hales, K.G., and Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved , Novel , Predicted GTPase. *Cell* 90, 121–129.

Hammermeister, M., Scho, K., and Westermann, B. (2010). Mdm36 Is a Mitochondrial Fission-promoting Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 21, 2443–2452.

Han, X., Lu, Y., Li, S., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. (2008). CaM kinase  $\alpha$ -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 182, 573–585.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hardwick, J.M., and Youle, R.J. (2010). Snapshot: BCL-2 proteins. *Proteins* 138, 11–14.

Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 30, 4356–4370.

Heath-Engel, H.M., Chang, N.C., and Shore, G.C. (2008). The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 27, 6419–6433.

Heimlich, G., McKinnon, A.D., Bernardo, K., Brdiczka, D., Reed, J.C., Kain, R., and Urgensmeier, J.M.J. (2004). Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on  $\alpha$ -helices-5 and -6. *Biochem. J.* 378, 247–255.

Heit, B., Yeung, T., and Grinstein, S. (2011). Changes in mitochondrial surface charge mediate recruitment of signaling molecules during apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C33–C41.

Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* 165, 167–173.

Herzig, S., and Martinou, J.-C. (2008). Mitochondrial dynamics: to be in good shape to survive. *Curr. Mol. Med.* 8, 131–137.

Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A., Bassik, M., Antonsson, B., Brandt, G., Iwakoshi, N., Schinzel, A., Glimcher, L., and Korsmeyer S.J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 $\alpha$ . *Science* (80-. ). 312, 572–576.

Heymann, J. a W., and Hinshaw, J.E. (2009). Dynamins at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3427–3431.

Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C.S., and Day, C.L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ.* 14, 128–136.

Hoffmann, B., Stockl, A., Schlame, M., Beyer, K., and Klingenberg, M. (1994). The Reconstituted ADP / ATP Carrier Activity Has an Absolute Requirement for Cardiolipin as Shown in Cysteine Mutants \*. *J. Biol. Chem.* 269, 1940–1944.

Hope, M. J., Bally, M.B., Webb, G., and Cullis, P.R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55–65.

Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751–780.

Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol. Cell* 41, 150–160.

Horvath, S.E., and Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* 52, 590–614.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E., H, D.A.R.S., Medicine, R.S.H., and Surgery, R.S.H. (2009). Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N. Engl. J. Med.* 361, 1570–1583.

Houtkooper, R.H., Akbari, H., Lenthe, H. Van, Kulik, W., Wanders, R.J.A., and Frentzen, M. (2006). Identification and characterization of human cardiolipin synthase. *FEBS Lett.* 580, 3059–3064.

Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J.W. (1998). A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* *273*, 30139–30146.

Hsu, Y. Te, and Youle, R.J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* *272*, 13829–13834.

Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* *273*, 10777–10783.

Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A.J.W. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12401–12406.

Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., and Blackstone, C. (2009). A Class of Dynamin-like GTPases Involved in the Generation of the Tubular ER Network. *Cell* *138*, 549–561.

Hu, X., Han, Z., Wyche, J.H., and Hendrickson, E.A. (2003). Helix 6 of tBid is necessary but not sufficient for mitochondrial binding activity. *Apoptosis* *8*, 277–289.

Huang, H.W. (2000). Action of Antimicrobial Peptides : Two-State Model. *Biochemistry* *39*.

Huang, P., Yu, T., and Yoon, Y. (2007). Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur. J. Cell Biol.* *86*, 289–302.

Hunter, D.G., and Frisken, B.J. (1998). Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles. *Biophys. J.* *74*, 2996–3002.

Igaki, T., and Miura, M. (2004). Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* *1644*, 73–81.

Imai, H., Koumura, T., Nakajima, R., Nomura, K., and Nakagawa, Y. (2003). Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. J.* *371*, 799–809.

Inohara, N., Ekhterae, D., Garcia, I., Carrio, R., Merino, J., Merry, a., Chen, S., and Nunez, G. (1998). Mtd, a Novel Bcl-2 Family Member Activates Apoptosis in the Absence of Heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Biol. Chem.* *273*, 8705–8710.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* *25*, 2966–2977.

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y.-I., Taguchi N., Morinaga H., Maeda M., Takayanagi R., Yokota S. and Mihara K. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* *11*, 958–966.

Jalmar, O., François-Moutal, L., García-Sáez, A.-J., Perry, M., Granjon, T., Gonzalez, F., Gottlieb, E., Ayala-Sanmartin, J., Klösigen, B., Schwille, P., and Petit P.X. (2013). Caspase-8 binding to



cardiolipin in giant unilamellar vesicles provides a functional docking platform for bid. *PLoS One* **8**, e55250.

Janko, C., Jeremic, I., Biermann, M., Chaurio, R., Schorn, C., and Mu, L.E. (2013). Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell. *Phys. Biol.* *065006*.

Janmey, P.A., and Kinnunen, P.K.J. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* *16*, 538–546.

Jiang, F., Ryan, M.T., Zhao, M., Gu, Z., Pfanner, N., Miriam, L., Schlame, M., Klingenberg, M., and Greenberg, M.L. (2000). Absence of Cardiolipin in the *crd1* Null Mutant Results in Decreased Mitochondrial Membrane Potential and Reduced Mitochondrial Function Absence of Cardiolipin in the *crd1* Null Mutant Results in Decreased Mitochondrial Membrane Potential and Reduced Mitoch. *J. Biol. Chem.* *275*, 22387–22394.

Jiang, X., Jiang, H., Shen, Z., and Wang, X. (2014). Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *1–6*.

Jin, A.J., Huster, D., Gawrisch, K., and Nossal, R. (1999). Light scattering characterization of extruded lipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* *28*, 187–199.

Johnson, E.S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* *147*, 981–993.

Kagan, V.E., Tyurin, V. a, Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A. a, Osipov, A.N., Belikova, N. a, Kapralov, A. a, Kini, V., Vlasova I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svitunencko D.A., Kurnikov I.V. and Borisenko G.G. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 223–232.

Kalanxhi, E., and Wallace, C. (2007). Cytochrome c impaled: Investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochem. J.* *407*, 179–187.

Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931–938.

Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* *443*, 658–662.

Kasahara, A., and Scorrano, L. (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol.* *24*, 761–770.

Katayama, K., Sakurai, I., and Wada, H. (2004). Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Lett.* *577*, 193–198.

Ke, F., Voss, a, Kerr, J.B., O'Reilly, L. a, Tai, L., Echeverry, N., Bouillet, P., Strasser, a, and Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ.* *19*, 915–925.

Ke, F., Bouillet, P., Kaufmann, T., Strasser, a, Kerr, J., and Voss, a K. (2013). Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis.* *4*, e650.

- Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* *1751*, 119–139.
- Kenniston, J. a, and Lemmon, M. a (2010). Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* *29*, 3054–3067.
- Kiebish, M.A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J.H., and Seyfried, T.N. (2008). Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J. Lipid Res.* *49*, 2545–2556.
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y., and Hayasaka K. (2005). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot – Marie – Tooth neuropathy type 2A. *Hum. Genet.* *116*, 23–27.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 487–499.
- Klee, M., and Pimentel-Muiños, F.X. (2005). Bcl-XL specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *168*, 723–734.
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., and Pimentel-Muiños, F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J.* *28*, 1757–1768.
- Koch, A., Thiemann, M., Grabenbauer, M., Yoon, Y., McNiven, M. a, and Schrader, M. (2003). Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J. Biol. Chem.* *278*, 8597–8605.
- Koirala, S., Guo, Q., Kalia, R., Bui, H.T., Eckert, D.M., Frost, A., and Shaw, J.M. (2013). Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1342–E1351.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* *427*, 461–465.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* *325*, 477–481.
- Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* *339*, 464–467.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science* (80-. ). *305*, 858–862.
- Krieger, C., and Duchen, M.R. (2002). Mitochondria , Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *Eur. J. Pharmacol.* *447*, 177–188.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V, Malorni, W., Knight, R. a, Piacentini M., Nagata S. and Melino G. (2005).

Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 2*, 1463–1467.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* *87*, 99–163.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B. and Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* *16*, 3–11.

Kushnareva, Y., Andreyev, A.Y., Kuwana, T., and Newmeyer, D.D. (2012). Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. *PLoS Biol.* *10*, e1001394.

Kutik, S., Rissler, M., Guan, X.L., Guiard, B., Shui, G., Gebert, N., Heacock, P.N., Rehling, P., Dowhan, W., Wenk, M.R., Pfanner N. and Wiedemann N. (2008). The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *J. Cell Biol.* *183*, 1213–1221.

Kutik, S., Stroud, D. a, Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2009). Evolution of mitochondrial protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 409–415.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* *111*, 331–342.

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B. a, Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell* *17*, 525–535.

Van der Laan, M., Meinecke, M., Dudek, J., Hutu, D.P., Lind, M., Perschil, I., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N., and Rehling, P. (2007). Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1152–1159.

Lackner, L.L., and Nunnari, J.M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 1138–1144.

Lackner, L.L., Horner, J.S., and Nunnari, J. (2009). Mechanistic analysis of a dynamin effector. *Science* *325*, 874–877.

Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* *12*, 887–896.

Lamb, H.M., and Hardwick, J.M. (2013). Unlatched BAX pairs for death. *Cell* *152*, 383–384.

Landes, T., Emorine, L.J., Courilleau, D., Rojo, M., Belenguer, P., and Arnauné-Pelloquin, L. (2010). The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep.* *11*, 459–465.

Landeta, O., Landajuela, A., Gil, D., Taneva, S., Di Primo, C., Sot, B., Valle, M., Frolov, V. a, and Basañez, G. (2011). Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. *J. Biol. Chem.* *286*, 8213–8230.

Landeta, O., Garcia valero, J., Flores-romero, H., Bustillo-zabalbeitia, I., Landajuela, A., Garcia-porras, M., Terrones, O., and Basañez, G. (2014). Lipid-Dependent Bimodal MCL1 Membrane Activity. *ACS Chem. Biol.* *9*, 2852–2863.

Larsen, N.B., Rasmussen, M., and Rasmussen, L.J. (2005). Nuclear and mitochondrial DNA repair : similar pathways ? *Mitochondrion* *5*, 89–108.

Lauber, K., Bohn, E., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth I.B., Schulze-Osthoff K., Belka C. Stuhler G. and Wesselborg S. (2003). Apototic cells induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* *113*, 717–730.

Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* *118*, 265–267.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* *12*, 897–911.

Leber, B., Lin, J., and Andrews, D.W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* *29*, 5221–5230.

Lee, H., Rotolo, J. a, Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W.-C., Yin, X., Ragupathi, G., Ehleiter, D., Gulbins, E., Zhai D., Reed J.C., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z. and Kolesnick R.(2011). Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS One* *6*, e19783.

Lee, M., Hung, W., Chen, F., and Huang, H.W. (2008). Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5087–5092.

Lemmon, M.A. (2013). Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp* *81*–93.

Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology ( PH ) domains. *Biochem. J.* *350*, 1–18.

Leonard, M., Song, B.D., Rajesh, R., and Schmid, S.L. (2005). Robust Colorimetric Assays for Dynamin ' s Basal and Stimulated GTPase Activities. *Methods Enzymol.* *404*, 490–503.

Leshchiner, E.S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E986–E995.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.

- Lewis, R.N. a H., and McElhaney, R.N. (2009). The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1788*, 2069–2079.
- Lewis, J., Oyler, G. a, Ueno, K., Fannjiang, Y.R., Chau, B.N., Vornov, J., Korsmeyer, S.J., Zou, S., and Hardwick, J.M. (1999). Inhibition of virus-induced neuronal apoptosis by Bax. *Nat. Med.* *5*, 832–835.
- Li, H., Chen, Y., Jones, A.F., Sanger, R.H., Collis, L.P., Flannery, R., McNay, E.C., Yu, T., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Bossy-Wetzel E., Bennett M.V.L., Pypaert M., Hickman J.A., Smith P.J.A., Hardwick M. and Jonas E.A. (2008). Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2169–2174.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Lindahl, E., and Sansom, M.S.P. (2008). Membrane proteins : molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 425–431.
- Lindsten, T., Ross, a J., King, a, Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H. a, Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen Y., Wei M., Eng V.M., Adelman D.M., Simon M.C., Ma A., Golden J.A., Evan G., Korsmeyer S.J., MacGregor G.R. and Thompson C.B.(2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* *6*, 1389–1399.
- Liu, Q.A., and Shio, H. (2008). Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both Bcl-w and the glutamate receptor ??2. *PLoS Genet.* *4*.
- Liu, J., Chen, J., Dai, Q., and Lee, R.M. (2003a). Phospholipid Scramblase 3 Is the Mitochondrial Target of Protein Kinase C  $\delta$  -induced Apoptosis. *Cancer Res.* *63*, 1153–1156.
- Liu, J., Epand, R.F., Durrant, D., Grossman, D., and Chi, N. (2008). Role of phospholipid scramblase 3 in the regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochemistry* *47*, 4518–4529.
- Liu, Q., Leber, B., and Andrews, D.W. (2012). Interactions of pro-apoptotic BH3 proteins with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins measured in live MCF-7 cells using FLIM FRET. *Cell Cycle* *11*, 3536–3542.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in Cell-Free Extracts : Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* *86*, 147–157.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2003b). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* *19*, 341–352.

Llambi, F., and Green, D.R. (2011). Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 12–20.

Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* *135*, 1074–1084.

Lu, B., Xu, F.Y., Jiang, Y.J., Choy, P.C., Hatch, G.M., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding human cardiolipin synthase ( hCLS1 ). *J. Lipid Res.* *47*, 1140–1145.

Lu, Y., Rolland, S.G., and Conradt, B. (2011). A molecular switch that governs mitochondrial fusion and fission mediated by the BCL2-like protein CED-9 of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E813–E822.

Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.-C. (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ.* *15*, 929–937.

Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T. a, Yang, L., and Huang, H.W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* *35*, 13723–13728.

Luisi, P.L., and Walde, P. (2000). Giant Vesicles. *Perspectives in Supramolecular Chemistry*.

Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *2*, 754–761.

Lutter, M., Perkins, G. a, and Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.* *2*, 22.

Ma, L., Vaz, F.M., Gu, Z., Wanders, R.J.A., Miriam, L., and Greenberg, M.L. (2004). Metabolism and Bioenergetics : The Human TAZ Gene Complements Mitochondrial Dysfunction in the Yeast *taz1*  $\Delta$  Mutant : IMPLICATIONS FOR BARTH SYNDROME The Human TAZ Gene Complements Mitochondrial Dysfunction in the Yeast *taz1*  $\Delta$  Mutant. *J. Biol. Chem.* *279*, 44393–44399.

Ma, S., Hockings, C., Anwari, K., Kratina, T., Fennell, S., Lazarou, M., Ryan, M.T., Kluck, R.M., and Dewson, G. (2013). Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the Bak protein  $\alpha 6$  helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *288*, 26027–26038.

Ma, S.B., Nguyen, T.N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D.A., Menard, M., Kluck, R.M., Ryan, M.T., and Dewson, G. (2014). Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death : a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. 1925–1935.

Macdonald, P.J., Stepanyants, N., Mehrotra, N., Mears, J. a, Qi, X., Sesaki, H., and Ramachandran, R. (2014). A dimeric equilibrium intermediate nucleates Drp1 reassembly on mitochondrial membranes for fission. *Mol. Biol. Cell* *25*, 1905–1915.

Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique : a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1462*, 109–140.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* *6*, 853–859.

Von der Malsburg, A., Abutbul-Ionita, I., Haller, O., Kochs, G., and Danino, D. (2011). Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J. Biol. Chem.* *286*, 37858–37865.

Mancuso, D.J., Kotzbauer, P., Wozniak, D.F., Sims, H.F., Jenkins, C.M., Guan, S., Han, X., Yang, K., Sun, G., Malik, I., Conyers S., Green K.G., Schmidt R.E. and Gross R.W. (2009). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2 leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy, and cognitive dysfunction. *J. Biol. Chem.* *284*, 35632–35644.

Mannella, C. a (2006a). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* *1762*, 140–147.

Mannella, C. a (2006b). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 542–548.

Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* *21–38*.

Margulis, L., and Bermudes, D. (1985). Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* *1*, 101–124.

Marí, M., Colell, A., Morales, A., Caballero, F., Moles, A., Fernández, A., Terrones, O., Basañez, G., Antonsson, B., García-Ruiz, C., and Fernandez-Checa J.C. (2008). Mechanism of mitochondrial glutathione-dependent hepatocellular susceptibility to TNF despite NF-kappaB activation. *Gastroenterology* *134*, 1507–1520.

Marsh, D. (2010). Electron spin resonance in membrane research: Protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art. *Eur. Biophys. J.* *39*, 513–525.

Martínez-Abundis, E., Correa, F., Pavón, N., and Zazueta, C. (2009). Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J.* *276*, 5579–5588.

Martínez-Abundis, E., Correa, F., Rodríguez, E., Soria-Castro, E., Rodríguez-Zavala, J.S., Pacheco-Alvarez, D., and Zazueta, C. (2011). A CRAC-like motif in BAX sequence: relationship with protein insertion and pore activity in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 1888–1895.

Martinez-Caballero, S., Dejean, L.M., Kinnally, M.S., Oh, K.J., Mannella, C. a, and Kinnally, K.W. (2009). Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J. Biol. Chem.* *284*, 12235–12245.

Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ.* *13*, 1291–1295.

Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* *21*, 92–101.

- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L.A., Prévost, M.-C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., and Kroemer G. (1998). Bax and Adenine Nucleotide Translocator Cooperate in the Mitochondrial Control of Apoptosis. *Science* (80- ). *281*, 2027–2031.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* *35*, 11361–11368.
- Mayer, L.D., Hope, M.J., and Cullis, P.R. (1986). V e s i c l e s of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* *858*, 161–168.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* *16*, R551–R560.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2006). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *J. Mol. Biol.* *361*, 462–469.
- Mcquibban, G.A., Saurya, S., and Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* *423*, 537–541.
- Mears, J.A., and Hinshaw, J.E. (2008). Chapter 13 Visualization of Dynamins. *Methods Cell Biol.* *88*, 237–256.
- Mears, J. a, Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 20–26.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 112–124.
- Van der Merwe, P., and Barclay, A.N. (1994). Transient intercellular adhesion: The importance of weak protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* *19*, 354–358.
- Van der Merwe, P.A., and Barclay, A.N. (1996). Analysis of cell-adhesion molecule interactions using surface plasmon resonance. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 257–261.
- Mishra, P., and Chan, D.C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 634–646.
- Miura, M. (2011). Active participation of cell death in development and organismal homeostasis. *Dev. Growth Differ.* *53*, 125–136.
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., and Gehring, K. (2006). The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* *24*, 677–688.
- Moldoveanu, T., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Fitzgerald, P., Gehring, K., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2013). BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 589–597.



- Montero, J., Morales, A., Llacuna, L., Lluís, J.M., Terrones, O., Basañez, G., Antonsson, B., Prieto, J., García-Ruiz, C., Colell, A., and Fernández-Checa J.C. (2008). Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *68*, 5246–5256.
- Montero, J., Mari, M., Colell, A., Morales, A., Basañez, G., Garcia-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C. (2010). Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 1217–1224.
- Montes, L.-R., Ahyayauch, H., Iburguren, M., Sot, J., Alonso, A., Bagatolli, L.A., and Goñi, F.M. (2010). Electroformation of giant unilamellar vesicles from native membranes and organic lipid mixtures for the study of lipid domains under physiological ionic-strength conditions. *Methods Mol. Biol.* *606*, 105–114.
- Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzler, E., Basañez, G., Meda, P., and Martinou J.-C. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* *142*, 889–901.
- Mouritsen, O.G. (2011). Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* *113*, 1174–1187.
- Mozdy, A.D., Mccaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *J. Cell Biol.* *151*, 367–379.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, Craig B., Wong, S.-L., Ng S.-C. and Fesik S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-XL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335–341.
- Muenzner, J., and Pletneva, E. V (2014). Structural transformations of cytochrome c upon interaction with cardiolipin. *Chem. Phys. Lipids* *179*, 57–63.
- Mui, B., Chow, L., and Hope, M.J. (2003). Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size. *Methods Enzymol.* *367*, 3–14.
- Muñoz-Pinedo, C., Guío-Carrión, A., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2006). Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11573–11578.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* *434*, 652–658.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* *7*, 1019–1022.

- Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2006). Mdv1 Interacts with Assembled Dnm1 to Promote Mitochondrial Division \* □. *J. Biol. Chem.* *281*, 2177–2183.
- Nechushtan, a, Smith, C.L., Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* *18*, 2330–2341.
- Neutzner, A., and Youle, R.J. (2005). Instability of the Mitofusin Fzo1 Regulates Mitochondrial Morphology during the Mating Response of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 18598–18603.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., and Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: New implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* *170*, 1067–1078.
- Nieva, J., Goñi, F.M., and Alonso, A. (1989). Liposome Fusion Catalytically Induced by Phospholipase C. *Biochemistry* *28*, 7364–7367.
- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* *148*, 1145–1159.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2005). Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett.* *579*, 6031–6036.
- Nutt, L.K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D.J., and Swisher, S.G. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J. Biol. Chem.* *277*, 9219–9225.
- Oakes, S.A., Opferman, J.T., Pozzan, T., Korsmeyer, S., and Scorrano, L. (2003). Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Pharmacol.* *66*, 1335–1340.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 105–110.
- Oh, K., Barbuto, S., Meyer, N., Kim, R.S., Collier, M.J., and Korsmeyer, S.J. (2005). Conformational changes in BID, a pro-apoptotic BCL-2 family member, upon membrane binding: A site-directed spin labeling study. *J. Biol. Chem.* *280*, 753–767.
- Oh, K.J., Singh, P., Lee, K., Foss, K., Lee, S., Park, M., Lee, S., Aluvila, S., Park, M., Singh, P., Kim R-S., Symersky J. and Walters D.E. (2010). Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers. *J. Biol. Chem.* *285*, 28924–28937.
- Okada, H., Suh, W., Jin, J., Du, C., Elia, A., Duncan, G.S., Wakeham, A., Itie, A., Lowe, S.W. and Mak, T.W. (2002). Generation and Characterization of Smac / DIABLO-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3509–3517.

- Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., Oka, T., Takano H., Mizushima N., Mihara K. and Ishiara N. (2013). Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* *126*, 176–185.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *47*, 143–183.
- Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Tosetto, J., Moss, T.J., Faust, J.E., Micaroni, M., Egorova, A., Martinuzzi, A., McNew, J.A., and Daga A. (2009). Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* *460*, 978–983.
- Ortiz, a, Killian, J. a, Verkleij, a J., and Wilschut, J. (1999). Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophys. J.* *77*, 2003–2014.
- Osellame, L., Blacker, T., and Duchen, M. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. ...* *26*, 711–723.
- Osman, C., Voelker, D.R., and Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J. Cell Biol.* *192*, 7–16.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *191*, 1141–1158.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1259–1263.
- Ott, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2007). Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* *14*, 1243–1247.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* *12*, 565–573.
- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, S., Lamantea, E., Ferrero E. and Zeviani M. (2005). Complete loss of function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3079–3088.
- Palsdottir, H., and Hunte, C. (2004). Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* *1666*, 2–18.
- Pangborn, M.C. (1942). ISOLATION AND PURIFICATION OF A SEROLOGICALLY ACTIVE PHOSPHOLIPID FROM BEEF HEART. *J. Biol. Chem.* *143*, 247–256.
- Pautot, S., Frisken, B.J., and Weitz, D.A. (2003). Engineering asymmetric vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10718–10721.

- Peng, J., Tan, C., Roberts, G.J., Nikolaeva, O., Zhang, Z., Lapolla, S.M., Primorac, S., Andrews, D.W., and Lin, J. (2006). tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J. Biol. Chem.* *281*, 35802–35811.
- Petit, P.X., Lecoœur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., and Gougeon, M.L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.* *130*, 157–167.
- Petit, P.X., Dupaigne, P., Pariselli, F., Gonzalez, F., Etienne, F., Rameau, C., and Bernard, S. (2009). Interaction of the alpha-helical H6 peptide from the pro-apoptotic protein tBid with cardiolipin. *FEBS J.* *276*, 6338–6354.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1644*, 83–94.
- Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol. (Camb)*. *3*, 279–296.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L. a, McBride, H.M., Whitworth, A.J., and Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1638–1643.
- Pott, T., Bouvrais, H., and Philippe, M. (2008). Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lipids* *154*, 115–119.
- Qi, B., and Hardwick, J.M. (2008). Bcl-2 turns deadly. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 722–723.
- Qian, S., Wang, W., Yang, L., and Huang, H.W. (2008). Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17379–17383.
- Quinn, L., Coombe, M., Mills, K., Daish, T., Colussi, P., Kumar, S., and Richardson, H. (2003). Buffy , a *Drosophila* Bcl-2 protein , has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions. *EMBO J.* *22*.
- Quirós, P.M., Ramsay, A.J., Sala, D., Fernández-Vizarra, E., Rodríguez, F., Peinado, J.R., Fernández-García, M.S., Vega, J. a, Enríquez, J. a, Zorzano, A., and López-Otín C. (2012). Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J.* *31*, 2117–2133.
- Raunser, S., and Walz, T. (2009). Electron Crystallography as a Technique to Study the Structure on Membrane Proteins in a Lipidic Environment. *Annu. Rev. Biophys.* *38*, 89–105.
- Ray, J.E., Garcia, J., Jurisicova, a, and Caniggia, I. (2010). Mtd/Bok takes a swing: proapoptotic Mtd/Bok regulates trophoblast cell proliferation during human placental development and in preeclampsia. *Cell Death Differ.* *17*, 846–859.
- Reeves, J.P., and Dowben, R.M. (1969). Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.* *73*, 49–60.
- Rehm, M., Düsselmann, H., and Prehn, J.H.M. (2003). Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J. Cell Biol.* *162*, 1031–1043.

Reichert, A.S., and Neupert, W. (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria - Role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1592*, 41–49.

Ren, D., Tu, H.-C., Kim, H., Wang, G.X., Bean, G.R., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* *330*, 1390–1393.

Rhodes, G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear. A guide for users of macromolecular models.*

Richmond, D.L., Schmid, E.M., Martens, S., Stachowiak, J.C., Liska, N., and Fletcher, D.A. (2011). Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9431–9436.

Rismanchi, N., Soderblom, C., Stadler, J., Zhu, P.P., and Blackstone, C. (2008). Atlantin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1591–1604.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca Responses. *Science* (80-. ). *280*, 1763–1766.

Rodriguez, J.M., Glozak, M. a, Ma, Y., and Cress, W.D. (2006). Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *281*, 22729–22735.

Rodriguez-Lafrasse, C., Alphonse, G., Aloy, M.-T., Ardail, D., Gérard, J.-P., Louisot, P., and Rousson, R. (2002). Increasing endogenous ceramide using inhibitors of sphingolipid metabolism maximizes ionizing radiation-induced mitochondrial injury and apoptotic cell killing. *Int. J. Cancer* *101*, 589–598.

Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* *115*, 1663–1674.

Römer, W., Berland, L., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., Aly, M.R.E., Fraissier, V., Florent, J., Perrais, D., Lamaze, C., Raposo G., Steinem C., Senes P., Bassereau P. and Johannes L. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* *450*, 670–675.

Rong, Y.-P., Barr, P., Yee, V.C., and Distelhorst, C.W. (2009). Targeting Bcl-2 based on the interaction of its BH4 domain with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 971–978.

Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem. J.* *921*, 915–921.

Rujiviphat, J., Meglei, G., Rubinstein, J.L., and McQuibban, G.A. (2009). Phospholipid association is essential for dynamin-related protein Mgm1 to function in mitochondrial membrane fusion. *J. Biol. Chem.* *284*, 28682–28686.

- Rytomaa, M., and Kinnunen, P.K.J. (1995). Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* *270*, 3197–3202.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P.K., Kinnunen, P.K.J., Butcher, S.J., and Lappailanen, P. (2009). Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins. *Curr. Biol.* *19*, 95–107.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* *23*, 2861–2874.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., and Schlesinger, P.H. (2000a). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* *2*, 553–555.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., and Schlesinger, P.H. (2000b). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* *2*, 553–555.
- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.E., Driscoll, P.C., Waterfield M.D. and Panayotou G. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton 's tyrosine kinase. *EMBO J.* *15*, 6241–6250.
- Santiago, E., López-Moratalla, N., and Segovia, J.F. (1973). Correlation between losses of mitochondrial ATPase activity and cardiolipin degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *53*, 439–445.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* (80- ). *283*, 1488–1493.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson C.B and Fesik S.W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* (80- ). *275*, 983–986.
- Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial Outer Membrane Proteins Assist Bid in Bax-mediated Lipidic Pore Formation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2276–2285.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal. Biochem.* *199*, 223–231.
- Schellenberg, B., Wang, P., Keeble, J. a, Rodriguez-Enriquez, R., Walker, S., Owens, T.W., Foster, F., Taniaris-Hughes, J., Brennan, K., Streuli, C.H., and Gilmore A.P. (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol. Cell* *49*, 959–971.
- Schlame, M. (2008). Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid Res.* *49*, 1607–1620.
- Schlame, M., and Ren, M. (2006). Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* *580*, 5450–5455.

Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M.L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* *39*, 257–288.

Schön, P., García-Sáez, A.J., Malovrh, P., Bacia, K., Anderluh, G., and Schwille, P. (2008). Equinatoxin II Permeabilizing Activity Depends on the Presence of Sphingomyelin and Lipid Phase Coexistence. *Biophys. J.* *95*, 691–698.

Schug, Z.T., and Gottlieb, E. (2009). Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 2022–2031.

Schulman, J.J., Wright, F.A., Kaufmann, T., and Wojcikiewicz, R.J.H. (2013). The Bcl-2 protein family member bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and protects them from proteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* *288*, 25340–25349.

Schurtenberger, P., Mazer, N., Waldvogel, S., and Känzig, W. (1984). Preparation of monodisperse vesicles with variable size by dilution of mixed micellar solution of bile salt and phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* *775*, 111–114.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. a, Mannella, C. a, and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell* *2*, 55–67.

Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* *300*, 135–139.

Seabrook, S.A., and Newman, J. (2013). High-throughput thermal scanning for protein stability: Making a good technique more robust. *ACS Comb. Sci.* *15*, 387–392.

Sedgwick, H., Cameron, J.E., Poon, W.C.K., and Egelhaaf, S.U. (2007). Protein phase behavior and crystallization: Effect of glycerol. *J. Chem. Phys.* *127*.

Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2001). UGO1 Encodes an Outer Membrane Protein Required for Mitochondrial Fusion. *J. Cell Biol.* *152*, 1123–1134.

Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2004). Ugo1p Links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for Mitochondrial Fusion Ugo1p Links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for Mitochondrial Fusion \*. *J. Biol. Chem.* *279*, 28298–28303.

Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003). Mgm1p , a Dynamin-related GTPase , Is Essential for Fusion of the Mitochondrial Outer Membrane. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2342–2356.

Sesaki, H., Dunn, C.D., Iijima, M., Shepard, K. a, Yaffe, M.P., Machamer, C.E., and Jensen, R.E. (2006). Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J. Cell Biol.* *173*, 651–658.

Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 508–520.

- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–21.
- Shutt, T.E., and Gray, M.W. (2006). Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *TRENDS Genet.* 22.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson J.D. and Higgins D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Mitochondrial Membrane Contact Sites of Yeast. *J. Biol. Chem.* 266, 10047–10049.
- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.-H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* 24, 717–729.
- Simonen, M., Keller, H., and Heim, J. (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 249, 85–91.
- Sinibaldi, F., Fiorucci, L., Patriarca, A., Lauceri, R., Ferri, T., Coletta, M., and Santucci, R. (2008). Insights into Cytochrome c - Cardiolipin Interaction . Role Played by Ionic Strength †. *Biochemistry* 47, 6928–6935.
- Sinibaldi, F., Howes, B.D., Piro, M., Polticelli, F., Bombelli, C., Ferri, T., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, C. (2010). Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: A model for protein-mitochondrial membrane binding. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 689–700.
- Sinibaldi, F., Howes, B.D., Droghetti, E., Polticelli, F., Piro, M.C., Di Pierro, D., Fiorucci, L., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, R. (2013). Role of lysines in cytochrome c-cardiolipin interaction. *Biochemistry* 52, 4578–4588.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2002). Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 26796–26803.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliek, a M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143, 351–358.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, a M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245–2256.
- Smith, C.L. (2006). Basic Confocal Microscopy. *Curr. Protoc. Microbiol.* 681, 485–496.
- Smith, S.M. (2011). Strategies for the purification of membrane proteins. *Methods Mol. Biol.* 681, 485–496.
- Snook, C.F., Jones, J. a, and Hannun, Y. a (2006). Sphingolipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 927–946.



- Soleymanlou, N., Wu, Y., Wang, J.X., Todros, T., Ietta, F., Jurisicova, a, Post, M., and Caniggia, I. (2005). A novel Mtd splice isoform is responsible for trophoblast cell death in pre-eclampsia. *Cell Death Differ.* *12*, 441–452.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* *178*, 749–755.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3525–3532.
- Sorice, M., Circella, a, Cristea, I.M., Garofalo, T., Di Renzo, L., Alessandri, C., Valesini, G., and Esposti, M.D. (2004). Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* *11*, 1133–1145.
- Sorre, B., Callan-jones, A., Manzi, J., Goud, B., Prost, J., Bassereau, P., and Roux, A. (2011). Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 173–178.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., and Urbaniczky, C. (1991). Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interface Sci.* *143*, 513–526.
- Stenmark, H., and Aasland, R. (1999). FYVE-finger proteins – effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.* *112*, 4175–4183.
- Stiban, J., Fistere, D., and Colombini, M. (2006). Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* *11*, 773–780.
- Stone, K., and Williams, K. (1996). Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrylamide gels. In *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ,.
- Stone, S.J., and Vance, J.E. (2000). LIPIDS AND LIPOPROTEINS : Phosphatidylserine Synthase-1 and -2 Are Localized to Mitochondria-associated Membranes. *J. Biol. Chem.* *275*, 34534–34540.
- Stowell, M.H.B., Marks, B., Wigge, P., and McMahon, H.T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin : evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* *1*, 27–32.
- Strack, S., and Cribbs, J.T. (2012). Allosteric modulation of Drp1 mechanoenzyme assembly and mitochondrial fission by the variable domain. *J. Biol. Chem.* *287*, 10990–11001.
- Strasser, a, Harris, a W., Huang, D.C., Krammer, P.H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* *14*, 6136–6147.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* *30*, 3667–3683.
- Struck, D.K., Hoekstra, D., and Pagano, R.E. (1981). Use of Resonance Energy Transfer To Monitor Membrane Fusion. *Biochemistry* *20*, 4093–4099.

Subirade, M., Salesses, C., Marion, D., and Pérolet, M. (1995). Interaction of a Nonspecific Wheat Lipid Transfer Protein with Phospholipid Monolayers Imaged by Fluorescence Microscopy and Studied by Infrared Spectroscopy. *Biophys. J.* *69*, 974–988.

Susin, S. a, Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R.A., Siderovski J.M. and Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441–446.

Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* *103*, 645–654.

Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., and Rizzuto, R. (2004). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca<sup>2+</sup> Waves and Protects against Ca<sup>2+</sup>-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* *16*, 59–68.

Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Cell Biol.* *175*, 901–911.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* *7*, 880–885.

Szoka, F., and Papahadjopoulos, D. (1980). COMPARATIVE PROPERTIES PREPARATION OF LIPID VESICLES ( LIPOSOMES ). *Annu. Rev. Biophys. Bioenerg.* *9*, 467–508.

Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic Phosphorylation of Dynamins-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission \* □. *J. Biol. Chem.* *282*, 11521–11529.

Taha, T. a., Mullen, T.D., and Obeid, L.M. (2006). A house divided: Ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1758*, 2027–2036.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.

Tamba, Y., and Yamazaki, M. (2009). Magainin 2-Induced Pore Formation in the Lipid Membranes Depends on Its Concentration in the Membrane Interface. *J. Phys. Chem. B* *113*, 4846–4852.

Tamura, Y., Itoh, K., and Sesaki, H. (2011). SnapShot: Mitochondrial dynamics. *Cell* *145*, 1158, 1158.e1.

Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*, 2nd edition. Wiley Interscience, New York.

Taylor, W.A., and Hatch, G.M. (2009). Identification of the Human Mitochondrial Linoleoyl-coenzyme A Monolysocardiolipin Acyltransferase ( MLCL AT-1 ). *J. Biol. Chem.* *284*, 30360–30371.

Tenchov, B.G., Yanev, T.K., Tihova, M.G., and Koynova, R.D. (1985). A probability concept about size distributions of sonicated lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *816*, 122–130.

Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H.-G., Liu, J., Lee, R.M., Herrmann, A., and Basañez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J. Biol. Chem.* *279*, 30081–30091.

Terrones, O., Etxebarria, A., Landajuela, A., Landeta, O., Antonsson, B., and Basañez, G. (2008). BIM and tBID are not mechanistically equivalent when assisting BAX to permeabilize bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* *283*, 7790–7803.

Tilley, S.J., Orlova, E. V, Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* *121*, 247–256.

Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Youle, R.J., and Edlich, F. (2013). The C-terminal helix of Bcl-x(L) mediates Bax retrotranslocation from the mitochondria. *Cell Death Differ.* *20*, 333–342.

Todt, F., Cakir, Z., and Reichenbach, F Emschermann, F Lauterwasser, J. (2015). Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J.* *34*, 67–80.

Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J., and Santel, A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell S* *118*, 3049–3059.

Trouillard, M., Meunier, B., and Rappaport, F. (2011). Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E1027–E1034.

Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., and Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 1297–1300.

Ugarte-Urbe, B., Mueller, H., Otsuki, M., Nickel, W., and Garcia-Saez, A. (2014). Dynamin-related Protein 1 (Drp1) Promotes Structural Intermediates of Membrane Division. *J. Biol. Chem.* *289*, 30645–30656.

Valcarcel, C. a, Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M.E., and Menestrina, G. (2001). Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys. J.* *80*, 2761–2774.

Valero, J.G., Sancey, L., Kucharczak, J., Guillemin, Y., Gimenez, D., Prudent, J., Gillet, G., Salgado, J., Coll, J.-L., and Aouacheria, A. (2011). Bax-derived membrane-active peptides act as potent and direct inducers of apoptosis in cancer cells. *J. Cell Sci.* *124*, 556–564.

Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria . Phospholipid Mitochondria \* Synthesis in a Membrane Fraction Associated. *J. Biol. Chem.* *265*, 7248–7256.

Vartak, R., Porras, C.A.-M., and Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* *4*, 582–590.

Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., and Marzo, I. (2013). Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J. Biol. Chem.* *288*, 4935–4946.

Vera, L., Czarny, B., Georgiadis, D., Dive, V., and Stura, E.A. (2011). Practical Use of Glycerol in Protein Crystallization. *Cryst. Growth Des.* *11*, 2755–2762.

Verhoeven, K., Claeys, A.K.G., Zu, A.S., Seeman, P., Mazanec, R., Saifi, G.M., Szigeti, K., Mancias, P., Butler, I.J., Kochanski, A., Ryniewicz B., Bleecker J.D., Van Den Bergh P., Verellen C., Van Coster R., Goemans N., Auer-Grumbach., Roelens F., Vieregge P., Vinci P., Moreno M.T., Christen H., Shy M.E., Lupski J.R., Vance J.M., Jonghe P.D. and Timmerman V. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype / phenotype correlation in Charcot – Marie – Tooth type 2. *Brain* *129*, 2093–2102.

Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J. Cell Biol.* *186*, 805–816.

Walczak, H., and Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* *256*, 58–66.

Walensky, L.D. (2012). Stemming danger with Golgified BAX. *Mol. Cell* *46*, 554–556.

Wang, X., Olberding, K.E., White, C., and Li, C. (2011). Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 38–47.

Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* *177*, 439–450.

Weber, K., Harper, N., Schwabe, J., and Cohen, G.M. (2013). BIM-mediated membrane insertion of the BAK pore domain is an essential requirement for apoptosis. *Cell Rep.* *5*, 409–420.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, a, Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, a J., Roth, K. a, MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727–730.

Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J.E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J., and Gustafsson, C. (2009). Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS One* *4*, e7002.

Westermann, B. (2003). Mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1641*, 195–202.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 872–884.

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 521–531.

Westphal, D., Dewson, G., Menard, M., Frederick, P., Iyer, S., Bartolo, R., Gibson, L., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Adams, J.M., and Kluck R.M. (2014). Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* E4076–E4485.

Whelan, R.S., Konstantinidis, K., Wei, A.-C., Chen, Y., Reyna, D.E., Jha, S., Yang, Y., Calvert, J.W., Lindsten, T., Thompson, C.B., Crow M.T., Gavathiotis E., Dorn G.W., O'Rourke B. and Kitsis R.N. (2012). Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6566–6571.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* *19*, 1294–1305.

Wlodkovic, D., Skommer, J., and Darzynkiewicz, Z. (2012). CYTOMETRY OF APOPTOSIS . HISTORICAL PERSPECTIVE AND NEW ADVANCES. *Exp. Oncol.* *34*, 255–262.

Xu, J., Vanderlick, T.K., and Beales, P. (2013a). Lytic and non-lytic permeabilization of cardiolipin-containing lipid bilayers induced by cytochrome c. *PLoS One* *8*, e69492.

Xu, X.-P., Zhai, D., Kim, E., Swift, M., Reed, J.C., Volkmann, N., and Hanein, D. (2013b). Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death Dis.* *4*, e683.

Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., and Faden, A.I. (2004). BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 28367–28374.

Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H., and Newmeyer, D.D. (2008). Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol. Cell* *31*, 557–569.

Yethon, J. a, Epand, R.F., Leber, B., Epand, R.M., and Andrews, D.W. (2003). Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 48935–48941.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* *337*, 1062–1065.

Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 657–663.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 47–59.

Zaltsman, Y., Shachnai, L., Yivgi-Ohana, N., Schwarz, M., Maryanovich, M., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M., De Leonardis, F., Fiermonte, G., Palmieri, F., Gillissen B., Daniel P.T., Jimenez E., Walsh S., Koehler C.M., Roy S.S., Walter L., Hajnoczky G. and Gross A. (2010). MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *12*, 553–562.

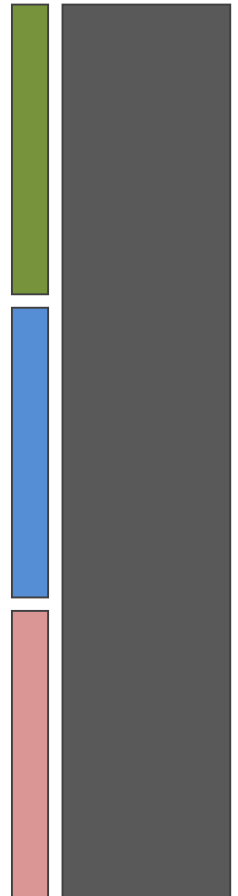
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., Valentino M.L., Rugolo M. and Carelli V. (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352–367.
- Zhang, T., and Saghatelian, A. (2013). Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 1542–1554.
- Zhang, Y., and Chan, D.C. (2007). New insights into mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* 581, 2168–2173.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 29403–29408.
- Zhang, Y., Chan, N.C., Ngo, H.B., Gristick, H., and Chan, D.C. (2012). Crystal Structure of Mitochondrial Fission Complex Reveals Scaffolding Function for Mitochondrial Division 1 ( Mdv1 ). *J. Biol. Chem.* 287, 9855–9861.
- Zhang, Z., Zhu, W., Lapolla, S.M., Miao, Y., Shao, Y., Falcone, M., Boreham, D., McFarlane, N., Ding, J., Johnson, A.E., Zhang X.C., Andrews D.W. and Lin J. (2010). Bax forms an oligomer via separate, yet interdependent, surfaces. *J. Biol. Chem.* 285, 17614–17627.
- Zhao, H., and Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein – lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* 23, 2823–2832.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Lendahl, U., and Niste, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* 30, 2762–2778.
- Zhou, L.L., Zhou, L.Y., Luo, K.Q., and Chang, D.C. (2005). Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis. *Apoptosis* 10, 289–299.
- Zick, M., Rabl, R., and Reichert, A.S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793, 5–19.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, a J., MacGregor, G.R., and Thompson, C.B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15, 1481–1486.
- Zong, W.X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.C., Yuan, J., and Thompson, C.B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59–69.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastián, D., Segalés, J., and Palacín, M. (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 566–574.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, a, and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413.

Züchner, S., Mersiyanova, I. V, Muglia, M., Bissar-tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman Y., Evgrafov O., Jonghe P.D., Takahashi Y., Tsuji S., Pericak-Vance M.A., Quattrone A., Schröder J.M. and Vance J.M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449–452.





# PUBLICATIONS





# PUBLICATIONS

1. Bustillo-Zabalbeitia, I., Montessuit, S., Raemy, E., Basañez, G., Terrones, O., and Martinou, J.-C. (2014) **Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of Dynamin-Related Protein 1.** *PLoS One.* **9**, e102738
2. Landeta, O., Garcia valero, J., Flores-romero, H., Bustillo-zabalbeitia, I., Landajuela, A., Garcia-porras, M., Terrones, O., and Basañez, G. (2014) **Lipid-Dependent Bimodal MCL1 Membrane Activity.** *ACS Chem. Biol.* **9**, 2852–2863