
Bases moleculares del proceso de muerte celular programada: implicaciones de la proteína supresora de tumores p53 y otras proteínas en el control del ciclo celular. Mecanismos de acción apoptótica. Revisión.

José Joaquín Merino y María Isabel Cordero-Campaña.

Departamento de Psicobiología, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Apdo N° 60.148. Madrid 28040, España.

Palabras clave: Apoptosis, Ciclina-CDK, Bcl-2 y Bax, enzima convertidora de interleucina, P53, P21, Bax/Fas/Bcl-2, ciclo celular, E2F, PCNA, proteína retinoblastoma, IRP, PARP-ADP-ribosa-polimerasa, Fas/Aop 1/CD95, factor de necrosis tumoral, TRADD y FADD, factor nuclear kappa β .

Resumen. La apoptosis es un mecanismo de daño celular que ocurre en el normal desarrollo y en la regulación de tejidos y órganos en vertebrados. Neuronas bajo apoptosis dependiente o independiente de p53, dependiendo UPON del estímulo que conduce a fragmentación del DNA. Muchas neuronas en el desarrollo del sistema nervioso sufren apoptosis, siendo la ciclina D1 un esencial mediador del daño celular neural. Otras características de apoptosis son la condensación del núcleo, la fragmentación de la cromatina junto a los sitios de ruptura en los nucleosomas, la rotura de la membrana y la formación de cuerpos apoptóticos. Entre los posibles mecanismos moleculares están: (a) la activación de proteasas, como ICE (II-1 β *converting enzyme*); y una pequeña Ribonucleoproteína U1, siendo sustratos para ICE y sus homólogos (tales como ICH y otras proteínas). El gen p53 codifica un factor de transcripción que contribuye a varias diferentes actividades celulares, incluyendo la apoptosis, la respuesta celular a la radiación, y la activación de proteínas tales como GADD, Bcl-2 (represor de apoptosis) y Bax. p53 ejecuta un papel como un inhibidor de apoptosis por transactivación de la expresión del gen Bax. El gen supresor de tumores

p53 limita la proliferación celular por parada del ciclo celular en G1, o por apoptosis, dependiendo del contexto celular. La proteína p21 es un inhibidor de ciclinas dependientes de kinasas, la cual es transactivada por p53. Durante la apoptosis hay una activación de c-myc, y del factor de transcripción NF-kB (factor nuclear kappa β), el cual es un importante regulador de la apoptosis. Como un ejemplo de señalización apoptótica nosotros hemos seleccionado el problema relatando el sistema Fas/APO en timocitos.

Molecular basis of programmed cell death: involvement of tumor suppressor protein p53 and other proteins in the control of the cellular cycle. Review.

Invest Clin 1998; 39(4) 323-358.

Key words: Apoptotic, cyclin-CDK, Prb, Bcl2, Bax, ICE, p53, p21, Bax/Fas/Bcl-2, cell cycle, E2F, PCNA, IRP, PARP-ADP-ribose polymerase, Fas/Apo I/CD95, INF, TRADD, FADD, NF-kB.

Abstract. Apoptosis is a mechanism of cell death that occurs in normal development and on the regulation of vertebrate tissues and organ cellularity. Neurons undergo p53-dependent and p53-independent apoptosis, depending upon the stimulus that triggers DNA fragmentation. Many neurons in the developing nervous system suffer apoptosis, with the cyclin D1 being an essential mediator of neuronal cell death. Other characteristics of apoptosis are: condensation of the nucleus, fragmentation of chromatin at nucleosome linkage sites, membrane blebbing, and the formation of apoptotic bodies. Among the possible molecular mechanisms are: (a) activation of proteases, as ICE (II-1 β converting enzyme); (b) calpain is activated in several cells, with PARP (Poli-ADP-ribose polymerase) and a small U1 Ribonucleoprotein, being substrates for ICE and its homologs such as ICH and others proteins. The p53 gene encodes a transcription factor that contributes to several different cellular activities, including apoptosis, the cellular response to radiation, and the activation of proteins such as GADD, Bcl-2 (represses to apoptosis) and Bax. P53 exerts a role as inductor of apoptosis by transactivating expression of the Bax gene. The p53 gene tumor suppressor limits cellular proliferation by including either the arrest of cell cycle in G1, or apoptosis, depending on the cellular context. The p21 is an inhibitor of cyclin-dependent kinase, which is transactivated by p53. During apoptosis, there is an activation of both, c-myc, and the transcription factor NF-kB, which is an important regulator of apoptosis. As an example of signalization of apoptosis we have selected to illustrate the problem related to the system Fas/APO in thymocytes.

Recibido: 17-2-98. Aceptado: 30-7-98.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los mecanismos moleculares de la apoptosis, proceso de muerte celular programada, cobra especial importancia en nuestros días, estando implicada en fenómenos fisiológicos, así como en el cáncer, y determinadas patologías neurodegenerativas, de ahí que un conocimiento exhaustivo de los mecanismos moleculares justifica la actual importancia del tema.

Se denomina apoptosis al conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos asociados a la muerte celular programada, constituyendo un mecanismo fisiológico de deleción de células que ocurre durante el control homeostático de los tejidos, en determinadas patologías (1), en el desarrollo pre y postnatal del CNS -sistema nervioso central-, actuando como un mecanismo regulador del desarrollo neuronal, (2) y en la diferenciación linfoide, entre otros procesos (3).

La maquinaria bioquímica de este proceso se encuentra en todas las células, activándose por determinadas señales bioquímicas. Es importante establecer las diferencias entre apoptosis y necrosis, caracterizándose la primera por: a) perturbación de la función mitocondrial, b) del DNA internucleosomal en múltiplos de 180 pares de bases, y c) formación de vesículas con restos celulares denominadas cuerpos apoptóticos (4). En la necrosis, básicamente se produce la destrucción de la membrana y de los orgánulos celulares (5,6).

Entre los mecanismos inductores de apoptosis se encuentran: la perturbación de moléculas de membrana, tales como los receptores Fas, TNF, etc., condiciones ambientales extremas, radiación ionizante, drogas, y diversos agentes químicos (7).

Durante la apoptosis, se expresan niveles elevados de una proteína crucial en dicho proceso, denominada p53 y que está implicada en múltiples funciones, tales como la reparación del DNA ante daño inducido por agentes genotóxicos, en la detención del ciclo celular en fase G1 por inhibición de los complejos ciclina-CDK a través de la transactivación de la proteína p21, en la respuesta celular ante la radiación ionizante o la propia inducción de apoptosis por transactivación de la proteína apoptótica Bax y represión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2; si la célula no es capaz de corregir los daños ocasionados en el DNA la célula entra en un proceso de muerte celular programada.

Durante la apoptosis se activan determinados oncogenes y factores de transcripción, como NF-kB, así como proteasas específicas ICE, que degradan proteínas citoesqueléticas, formándose como consecuencia cuerpos apoptóticos, con fragmentación internucleosomal del DNA, característica del proceso de apoptosis, y desorganización de la estructura de la cromatina (5).

Oncogen supresor p53: localización, estructura y función de la proteína p53

La localización exacta del gen p53 se ubica en el brazo corto del cromosoma 17, entre las bandas 17p12 y 17p13.3 (8). La mutación en el gen supresor p53 constituye la alteración génica más frecuente en la mayoría de las neoplasias humanas, con deleciones en p53, siendo marcadores en procesos tardíos de carcinogénesis (9).

Así, p53 está alterado en la mayoría de las neoplasias colorrectales, ya que la pérdida alélica del cromosoma 17p (Ch17p) es infrecuente en adenomas en cualquier estadio, pero ocurre en el 75% de los carcinomas colorrectales, lo que sugiere que la pérdida de la función p53 se asocia a la transición de adenoma benigno al maligno. En ciertas neoplasias, la inactivación de p53 puede estar implicada en la progresión, más que en la transformación tumoral, asociándose la metástasis a distancia con supresión completa de p53. Así, las alteraciones en el gen p53 determinan el comportamiento clínicoanatomopatológico y biológico de las neoplasias colorrectales humanas. Esta observación podría tener una repercusión sobre el tratamiento clínico y el pronóstico. Además, el hecho de que p53 tipo natural actúe como supresor tumoral se apoya en la observación de que en numerosas neoplasias ambos alelos están inactivados (10).

El gen p53 codifica una fosfoproteína nuclear de 53 Kd, detectable por inmunohistoquímica, estan-

do en las células normales en niveles prácticamente indetectables por su corta vida media (11).

p53 actúa como factor de transcripción formando homodímeros y transactivando genes específicos por unión a secuencias específicas del DNA. Entre los genes que activa p53, destacan aquellos cuyas proteínas, están implicadas en la parada del ciclo celular en fase G1, como el **p21 o Cip1/Waf1**; genes que intervienen en la reparación del DNA, como **GADD45**; y genes que inducen apoptosis, tales como **Bax y Fas**; entre los que reprime p53 destaca **Bcl-2** -proteína anti-apoptótica- (12,13).

Mecanismos de inactivación de proteína p53

p53 se puede inactivar por mutaciones mono o bialélicas que impiden su unión al DNA, o también por mutaciones sin sentido o sobre puntos de procesamiento del RNA mensajero de la propia proteína salvaje, impidiendo así la oligomerización de la misma, alterando consecuentemente su funcionalidad; también por secuestro de p53 salvaje por p53 mutada, o por interacción proteína-proteína con oncoproteínas vírales, se impediría la funcionalidad de p53. Entre estas proteínas vírales, destaca la proteína E6 del virus del papiloma humano, HPV, el antígeno T grande del virus SV40, y las oncoproteínas adenovirales E1A y E1B en animales (14).

La proteína codificada por el antígeno T grande, es capaz de unirse irreversiblemente a los dominios

más conservados de p53, (dominios 2 al 5), donde se producen la mayoría de las mutaciones en tumores humanos, que alteran puntualmente el sentido de lectura de p53. La unión de dicha oncoproteína viral, inactiva y transloca p53 al citoplasma, perdiéndose con ello la capacidad de transactivación de genes reguladores del ciclo celular, tales como p21.

Estructura molecular de la proteína p53

p53 es una proteína con un núcleo central muy conservado, un dominio de oligomerización, un dominio amino terminal de transactivación y un dominio carboxilo terminal (15) (Fig. 1).

El dominio amino-terminal constituye el dominio de transactivación para la maquinaria transcripcional (16) y también el dominio de interacción con reguladores negativos, tales como MDM2, (15,16, 17) y E1B 55 Kd (18,19), que bloquea el dominio de transactivación. El núcleo central de p53 está muy conservado -aminoácidos 102-292-, de tal manera que mutaciones en esta región inactivan la función supresora de

p53, mientras que los aminoácidos 319-360 corresponden al dominio de oligomerización de p53 (20) en el extremo carboxilo terminal.

Función de p53

El gen p53 denominado "guardián del genoma", regula múltiples componentes de las respuestas de control de lesión en el DNA (21), siendo los cánceres con déficits de p53 a menudo inestables, agresivos y resistentes al tratamiento (22). p53 transactiva una serie de genes, como p21 (inhibidor del ciclo celular en G1), Gadd45 (proteína que interviene en la reparación del DNA), Bax y Fas (ambos inductores de apoptosis); pero también reprime la expresión de otros como Bcl-2 (un represor de apoptosis), proteína con función antioxidante (23).

La detención del ciclo celular en G1 o la inducción de apoptosis dependerá en parte del estado de activación celular (24). La síntesis mantenida de p53 por una lesión extensa del DNA no reparada, o la activación de p53 después de una dedicación irreversible a la replicación, son factores que llevan a una célula a la apoptosis (25).

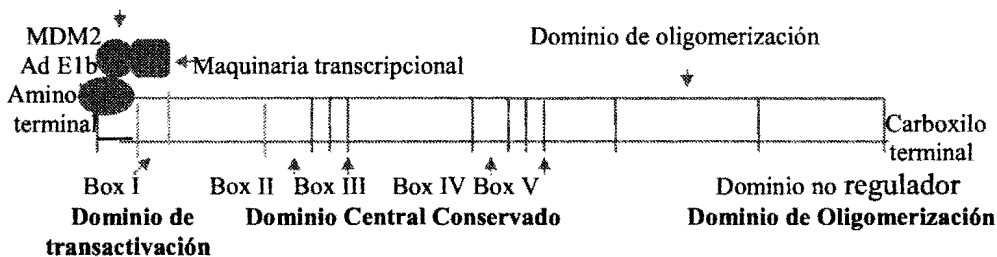


Fig. 1. Estructura molecular de p53.

Dado que las células que carecen de p53 no identifican adecuadamente el DNA alterado, pueden iniciar la mitosis antes de que se haya completado la segregación cromosómica. Así, se piensa que la inestabilidad cromosómica y la aneuploidia son consecuencias probables del déficit de p53 (26), ya que pérdidas génicas en el brazo corto del cromosoma 17, como deleciones en p53 se asocian con carcinoma colorrectal en más del 75% de dichos carcinomas, el 40% de los cánceres de mama (27), el 50% de los cánceres de pulmón, con deleciones de p53 en el 75% de los carcinomas colorrectales, presentando anomalías en la ploidía (28).

Así, en pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni tienen mutaciones hereditarias en el gen p53, falleciendo por cánceres aparecidos en distintas localizaciones.

p53 y ciclo celular: inhibición del ciclo celular por p53 en fase G1, transactivación de p21

p53 produce una detención del ciclo celular en fase G1 por transactivación de p21, ya que a través de su dominio amino-terminal inhibe los complejos CDK/ciclina (29), parando el ciclo celular en G1 (30,31) también puede inducirse independientemente de p53, como ocurre en la diferenciación terminal en el músculo cartilago, piel y mucosas (32).

p21 es un miembro de la familia de inhibidores de los complejos CDK/ciclina. La expresión del gen Cip1 está regulada por p53 y está ausente en las células que carecen

de p53. Así, en un modelo propuesto por Lane (33), las células en las que p53 está inactivado no accedían a la detención en G1, siendo genéticamente inestables, (26) dando lugar a clones malignos que crecen continuamente, de ahí la importancia de p53 en el cáncer (33).

Cuando hay lesiones en el DNA por radiaciones o diversos agentes genotóxicos: drogas, carcinógenos, p53 se acumula (en situaciones normales los niveles de p53 son muy bajos) por un mecanismo postraduccional, y no por hiperexpresión de p53, bloqueando el ciclo celular en G1 (34), para así reparar el daño inducido en el DNA (24).

Existe una acción directa e indirecta de p53 a través de la expresión de otros genes, ya que la proteína reconoce por su extremo carboxílico terminal lesiones puntuales (inserciones/deleciones) de varias bases que dificultan el normal apareamiento de las hebras del DNA (34).

La existencia de un complejo p53 altamente estable en el sitio de adhesión proporciona la base de reclutamiento y ensamblaje de los complejos multiproteicos necesarios para la expresión de genes inducibles por p53.

A pesar de todo, si la reparación no es posible, se induce la apoptosis. En las células tumorales este proceso se ve alterado y p53 no ejerce su función, de ahí que la regulación del ciclo celular en los "checkpoints" puntos de control del ciclo celular), desempeñe un papel crucial en la habilidad de p53 para detener el ciclo celular, existiendo

una interrelación entre las proteínas p53, GADD 45 y el antígeno de proliferación nuclear PCNA (35).

Puesto que p53 se degrada rápidamente en condiciones normales por la acción de una proteasa, y su vida media se prolonga tras el daño genómico, se produciría un cambio de conformación al unirse al DNA dañado, ocultando los puntos sensibles a la acción de la proteasa, de ahí su alta persistencia en la célula tumoral (36,37).

En ensayos "in vitro", realizados en líneas celulares de cáncer de colon con p53 inactivada, se produjo una supresión de la neoplasia por introducción de genes p53 funcionales, siendo éste un camino futuro para una posible terapia génica (22, 38).

p53 y radiación

La radiosensibilidad de las células es afectada por el tiempo de irradiación y por la fase del ciclo celular en que se encuentren, condicionantes básicos para la supervivencia celular, que va a ser diferente si se irradia en fase temprana o tardía en cultivos sincrónicos en G1, (menor supervivencia en la fase temprana). En cultivos asincrónicos, (con células en diferentes fases del ciclo celular) la respuesta de las células es muy diferente, estando la mayoría de las células en fase S (39).

Muchas células de mamíferos exhiben tránsitos retardados en G1 y G2 después de someterlas a irradiación (40). La activación de estos "checkpoints" puede afectar a la radiosensibilidad, pudiendo ser posi-

ble la reparación del DNA inducida por la radiación antes de la muerte celular (41,42,43,44).

Ante la exposición a una radiación ionizante, se requiere p53 para la detención en G1, exhibiendo mutantes en p53 tal deficiencia, con una baja tasa de detención del ciclo celular en G1 (39).

La irradiación de diversos tipos de células, permite observar una inducción rápida de los niveles de mRNA de GADD45 y de Bax en las células con p53 funcional, con respecto a células con mutaciones en p53, sugiriendo que dichos genes están implicados en la reparación de daños en el DNA por la radiación ionizante (45,46).

A diferencia de GADD45 y otros genes, Bax sólo se induce en las células normales en las que se consigue apoptosis tras la irradiación, aunque en todas ellas se ve descenso del mRNA de Bcl-2 y aumento de p53 (46,47).

Se aportan datos en la bibliografía de parada de la división en células replicativas ante exposición a la radiación ionizante, asociándose también con segregación cromosómica aberrante tras dicha exposición, implicándose a p53 en dicha radiosensibilidad en varios tipos celulares, y con la posibilidad de formación de tumores (48).

La influencia de la función de p53 en células radiosensibles no puede ser detectada en cultivos asincrónicos, induciéndose en cultivos sincrónicos ante bajas tasas de exposición radiante (4 Gy) una sobreexpresión de 4 veces los niveles

normales de p53, acumulándose las células en fase G1 (39).

Si se exponen células con proteína p53 inactivada a dosis más elevadas de radiación (16 Gy) durante un tiempo de exposición mucho más prolongado, aumenta la radiosensibilidad en dichos cultivos sincrónicos (39). Así, la parada del ciclo celular en G1 mediada por p53 que ocurre después de la irradiación, no ocurría en cultivos de fibroblastos diploides normales si estaban en fase G1 tardía (48,49), lo que pone de manifiesto la importancia de la proteína p53 en la radiosensibilidad de dichas células.

p53: control del ciclo celular y actuación como "guardián del genoma"

El control del ciclo celular se lleva a cabo por partida doble. Por estimulación de la expresión de p21, el producto del gen WAF1/Cip1, que media en la parada del ciclo celular al ser un potente inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas y en la apoptosis (29,30,50) ya que inhibe el complejo Cdk 2/Ciclina E, (51) y con ello, la hiperfosforilación de pRb (el producto del gen del retinoblastoma), y sus congéneres p107 y p120 (52) impidiendo así la liberación de las ciclinas D y los factores de transcripción de la familia E2F, con lo que el ciclo queda detenido en G1 (53,54,55,56).

Durante la fase G1 tardía se produce la activación de las quinasas dependientes de ciclina, activación esencial para la progresión del ciclo celular en G1 (54). El sustrato llave

de las quinasas dependientes de ciclina es pRb -retinoblastoma- (57). Además los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina D1, p16^{INK4A} y p18^{INK4C}, sólo detienen el ciclo en células expresando pRb funcional (58).

GADD45 Growth Arrest and DNA damage, es un miembro de una familia de genes inducidos coordinadamente por estímulos que producen detención de la proliferación celular y daños en el DNA, y cuya estimulación es estrictamente dependiente de p53 (59,35).

Implicaciones funcionales de p53 en apoptosis

Se ha comprobado que la proteína codificada por GADD impide la replicación del DNA mediante interacción con PCNA, una subunidad reguladora de la DNA polimerasa delta, -la DNA polimerasa más importante en la replicación- (60, 61,62, 63) realizando p21/Waf1 esta misma función a través de su extremo carboxílico (60); también se frena la transcripción de muchos genes, ya que p53 secuestra la proteína TBP (*TATA Binding protein*), que es una subunidad fundamental del factor basal TFID, necesario para la activación del complejo transcripcional (59,63) (Fig. 2).

ERCC3 -factor de transcripción implicado en la reparación por escisión de nucleótidos- y RPA -proteína de reparación del DNA, son dos proteínas que forman parte de un complejo multifactorial que funciona en la reparación por escisión de nucleótidos en el DNA humano (61,

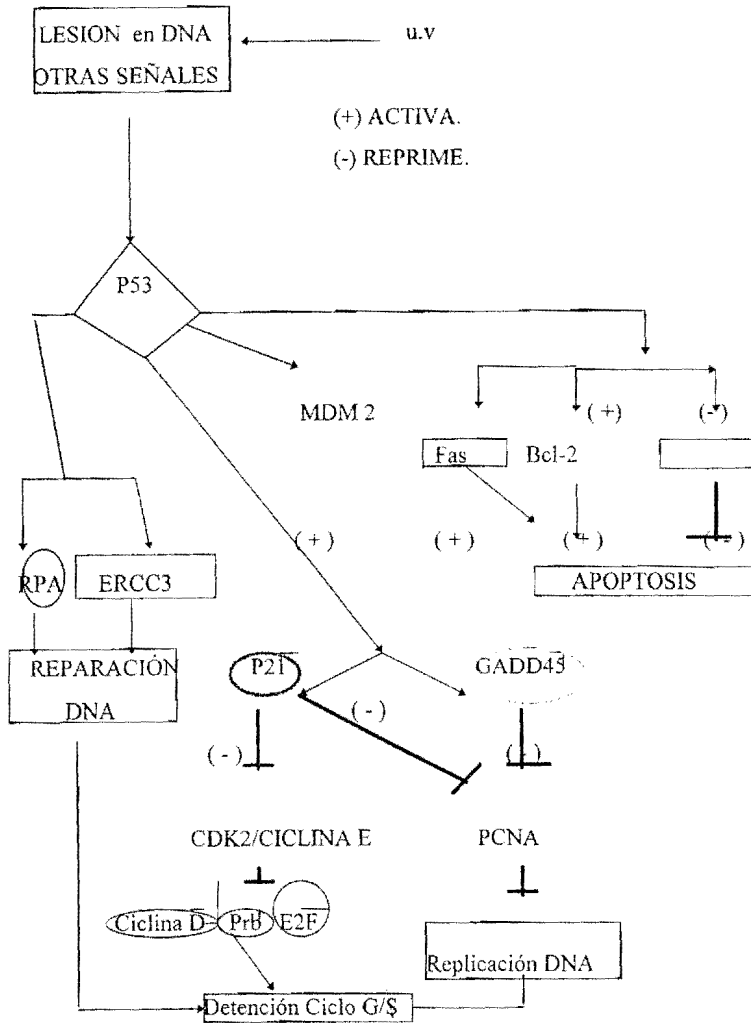


Fig. 2. Implicaciones funcionales de p53 en apoptosis.

63). Si la reparación no es posible, a pesar de todo, p53 induce la apoptosis.

A partir de estudios con pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (AT=Ataxia-Telangiectasia) se ha visto la deficiencia para producir reparación ante lesiones en el DNA.

(24), implicándose a una nueva quinasa similar a PI-3 kinasa (64).

Curiosamente, en las células de pacientes con AT, al contrario que en células de individuos normales, no hay bloqueo de las horquillas de replicación cuando aparecen lesiones en el DNA (65).

Estas proteínas pueden constituir una nueva familia de quinasas que envían información sobre el estado de la estructura de los cromosomas a la maquinaria del ciclo celular (64).

Se ha evidenciado que deleciones en p53 provocan alteraciones de la ploidía (66) con incidencia de tumores, como consecuencia de que la mutación en p53 afecta al ciclo celular en G1, produciéndose amplificaciones génicas como consecuencia de la no funcionalidad de la proteína p53 (67).

Cuando se produce un daño leve o moderado en el DNA, se induce una señal que estabiliza p53, aumentando temporalmente su nivel para reparar el daño; posteriormente los niveles de p53 decaen y el ciclo celular prosigue. Si el daño es elevado, la señal persiste, induciéndose p53 constitutivamente, desencadenando la apoptosis y apareciendo células con múltiples alteraciones genéticas, con translocaciones, amplificaciones génicas y otros reordenamientos cromosómicos comúnmente encontrados en muchos tumores (26,66,67). Dado que las células que carecen de p53 no identifican adecuadamente el DNA alterado, pueden iniciar la mitosis antes de que se haya completado la segregación cromosómica y la formación del huso. Se piensa que la inestabilidad cromosómica y la aneuploidia son consecuencias probables del déficit de p53 (26), apareciendo estos déficits genéticos en líneas de glioblastoma expuestas a la radiación ionizante (68). En otros muchos tu-

morens humanos, como en los tumores cerebrales (69), se han encontrado mutaciones en p53, o también en el linfoma de Burkitt, pero en este caso las mutaciones se encuentran en el gen *c-myc* (70).

PAPEL DE PRB (RETINOBLASTOMA) EN LA APOPTOSIS

Se ha visto en ratones transgénicos, que la ausencia de expresión de pRb (71,72), o su inactivación por secuestro por la proteína E7 del virus del papiloma humano HPV-16, produce una amplísima apoptosis, a no ser que se inactive también p53. (73).

Estructura de pRb

Rb presenta 4 dominios característicos, el dominio amino terminal, requerido para la oligomerización de la proteína (74), el dominio A (aminoácidos 394-571) y el dominio B (aminoácidos 649-773), ambos ubicados en posición central, así como una región próxima al dominio carboxilo terminal requerida para la supresión del crecimiento. Dentro del dominio B, existe el subdominio TH, presente también en las ciclinas y en el factor de transcripción IIB (63) (Fig. 3).

La expresión de pRb en células *HeLa* las protege de la apoptosis que normalmente induce en ellas p53 (75). También en células deficitarias en pRb y p53, muy sensibles por tanto a la apoptosis inducida por radiación, ésta se evitó con la transfección de pRb normal.

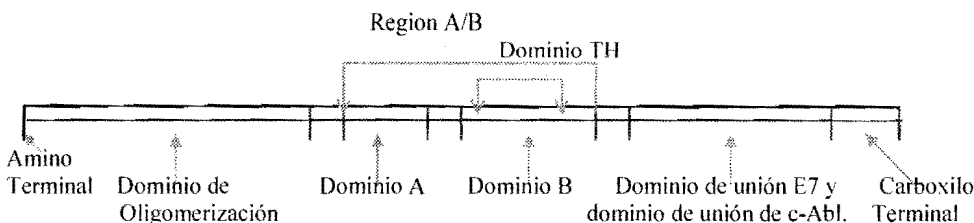


Fig. 3. Estructura de pRb.

Se ha visto que fibroblastos embrionarios de ratón, carentes de pRb (por inactivación génica experimental), entran precozmente en fase S (76), debido a la activación de dos genes: *dihidrofolato reductasa* y *timidilato sintasa*, -dependientes de E2F para su transcripción- (77), produciéndose una extensa apoptosis en presencia de p53 activa, si pRb no es funcional (76,78). Por otro lado, en las células con niveles E2F altamente constitutivos, la presencia o activación de p53 da lugar a una extensa apoptosis, en vez de detener el ciclo celular en G1 (78).

En fibroblastos con al menos una copia del gen RB se producía una detención del ciclo celular en G1, implicándose a la ciclina D1 en la inhibición y reparación de la síntesis del DNA en fibroblastos humanos (79).

Así, ratones con deficiencia en la proteína retinoblastoma muestran defectos en la neurogénesis y en la hematopoyesis (80).

Papel de la ciclina D1 y las CDK (quinásas dependientes de ciclina) durante la fase G1 de la apoptosis. ¿Vía dependiente de p53?

La vía por la que los niveles elevados de ciclina son capaces de in-

ducir apoptosis es independiente de p53. Se ha visto que el oncogén supresor p53 regula algunas, pero no todas las rutas implicadas en apoptosis (81).

Por otro lado, la sobreactivación de oncogenes, como c-myc, de E2F (83) y adenovirus E1A causa transformación celular, pero también puede causar apoptosis, estableciéndose un equilibrio entre la apoptosis y la proliferación/diferenciación celular (82,83,84), estando implicados niveles elevados de ciclina D1 en procesos de transformación tumoral, y también en procesos de apoptosis (85,86).

Se ha visto artificialmente, que niveles elevados de ciclina D1 inducen apoptosis por sí misma, con activación de proto-oncogenes, sobre todo c-jun y ciclina D (87).

Muchas neuronas en el desarrollo del sistema nervioso están sujetas a un proceso de muerte celular programada, implicándose a la ciclina D1 en este proceso, identificándose a c-jun como marcador característico de apoptosis neuronal (88)

Por otro lado, se ha implicado a nivel de sistema nervioso a la glia en los procesos de regulación de la muerte neuronal, confiriendo las

neurotrofinas un efecto protector frente a la apoptosis. Así, la muerte neuronal se acompaña de gliosis y expresión de la proteína del estrés Hsp 72, además de los oncogenes c-fos y c-jun (88).

La apoptosis inducida por ciclina D1, puede ser inhibida por 21 Kda, E1B, Bcl-2 y pRb, entre otros. Estos niveles altos de ciclina D1, se corresponden con niveles incrementados de cdk 4/6quinasas dependientes de ciclina D1 (89); como confirma el hecho de que inhibidores de ciclina, p16^{INK4} protegen a las células de la apoptosis (54,90,91).

La ciclina D regula la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular por estimulación de cdk4 o cdk 6-ciclina D dependiente de quinasas, (53, 92,93), siendo un importante sustrato de estas quinasas el producto del gen de susceptibilidad a retinoblastoma (94).

En fase G1 la defosforilación de pRb suprime la iniciación de la fase S (94,95,96), pero durante la mitad del ciclo celular pRb es progresivamente fosforilado por cdk en G1, lo que supone una parada del ciclo celular (53). La quinasa dependiente de ciclina D es solo requerida para la progresión del ciclo celular en células con pRb funcional (56); siendo un sustrato llave para las quinasas dependientes de ciclina D (98). El uso de inhibidores específicos de quinasas cdk 4/6, como p16^{INK4A}, confirma que la inducción de quinasas dependientes de ciclina D1 es un prerrequisito esencial para la inducción de apoptosis por ciclina D1 (97,99).

Se ha documentado en numerosos estudios que la sobreexpresión de ciclina D1 conduce a la transformación oncogénica (100). Kranerburg construyó vectores introduciendo el gen de la ciclina D1 en CMV -citomegalovirus-, y transfectándolo en células con p53 funcional y mutada; concluyendo que la apoptosis inducida por ciclina D1 es similar en células p53 +/+ y células p53 -/-, lo que corrobora que p53 no es requerido para la apoptosis inducida por niveles elevados de ciclina D1 (100).

Una disminución de la sensibilidad de pRb en la apoptosis inducida por metotrexato, evidencia que la pérdida de pRb conduce a la apoptosis durante el desarrollo en ratones (76,77).

Genes implicados en la apoptosis

La función reguladora de la apoptosis corresponde al complejo Bcl-2/BAG-1/Bax, siendo especialmente importantes p53, Myc y NF-kB, que son capaces de activar genes fundamentales en dicho proceso.

Papel del oncogen myc en la apoptosis

En condiciones de genotoxicidad por fármacos, falta de nutrientes, privación de factores de crecimiento, o por expresión de c-myc, p53 juega un papel preponderante. Así, en células de linfoma T por transfección de v-myc, p53 es capaz de inducir apoptosis, que puede inhibirse mediante la expresión de Bcl-2 (101) y también por algunas

citoquinas, como ocurre en fibroblastos (87,102,103,104).

Igualmente la sobreexpresión de c-myc en fibroblastos quiescentes induce apoptosis sólo en presencia de p53 normal; así en células progenitoras hematopoyéticas de ratón con mutaciones dominantes negativas en p53 (104) inactivantes de p53 resultaron en una disminución de la apoptosis. (105).

Myc actúa favoreciendo la hiperfosforilación de retinoblastoma (pRb), con la subyacente liberación de E2F, induciendo así apoptosis (106,107). Además, Myc podría estimular directamente la transcripción de Bax (108) que actúa como inductor de apoptosis. Este gen, además de poseer un elemento de control positivo para unión y estimulación de p53, dispone de cuatro secuencias consenso para Myc y sus homólogos (CACGTG) en la región 5' no traducida de la proteína, que podría ser importante también para su transactivación (109). Por otro lado, Bcl-2 dispone también de un elemento de control negativo para p53 (110).

Proteína Bcl-2 y Bax: agonistas y antagonistas, implicaciones y relaciones con la proteína p53 en la apoptosis

Bcl-2 ha sido incluido dentro de una serie de oncogenes reguladores del ciclo celular, estando implicado en la regulación de la viabilidad de células del sistema inmune (3,111, 12,113,114) y también el sistema nervioso (115), previniendo el daño inducido en neuronas sim-

páticas (116), actuando las neurotrofinas junto a Bcl-2 durante el desarrollo del sistema nervioso (117, 118,119).

El gen Bcl-2 es un elemento clave en la regulación de la apoptosis; p53 actúa induciendo la expresión de Bax y reprimiendo la expresión de Bcl-2 (120). En líneas celulares, se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 confiere resistencia a la muerte celular en respuesta a determinadas drogas usadas en quimioterapia como el arabinosido de citosina, metotrexano, vincristina y cisplatino (121), ya que la mayoría de estos compuestos inducen un daño severo en el DNA que provoca la muerte celular por apoptosis; de ahí la importancia del estudio del gen supresor de tumores p53, como queda patente en la inhibición del daño celular por expresión de Bcl-2 (122) y en la atenuación de la isquemia focal en ratones transgénicos en los que se clonó el gen p53 (123), estando también implicado en la inhibición de la citólisis de células T (124) y en linfomas foliculares (125).

La célula dispone de un mecanismo bastante equilibrado en el mecanismo de apoptosis a través de Bcl-2, Bcl-X_L, y otras proteínas relacionadas, pudiendo interaccionar Bcl-2 incluso con oncoproteínas virales -siendo ésta una de las posibles vías inductoras de tumores por virus al inactivar la proteína supresora de tumores p53 (126).

Bcl-2 es una proteína antioxidante, que evita el daño inducido por estrés oxidativo en componentes

celulares, evitando así la peroxidación lipídica (127), ya que frena la apoptosis inducida por especies reactivas de oxígeno en neuronas (128), en condiciones de muy baja oxigenación, o incluso por privación de oxígeno (129).

Bcl-2 se encuentra en la célula en regiones proliferativas o zonas con larga supervivencia (130), ubicándose especialmente en compartimentos subcelulares tales como el núcleo, las membranas mitocondriales y el retículo endoplasmático, donde reprime la apoptosis regulando el flujo de calcio (131,132). Bcl-2 por splicing alternativo da lugar a dos proteínas: Bcl-2 α y Bcl-2 β no se encuentra en cantidades apreciables in vivo, no requiriendo Bcl-2 α estar anclada a la membrana (133).

Bcl-2, proteína de 24-26 KD, presenta un elemento de respuesta negativa, de tipo silenciador, -p53 dependiente-, localizado en la región 5' no traducida, así como el elemento conservado de respuesta negativa BIE 1 (de 11 pares de bases), no dependiente de p53, que colabora en la represión de la expresión de Bcl-2 en muchos tipos celulares (110).

P53 activa la transcripción de Bax y reprime la expresión de Bcl-2, gracias al silenciador negativo de p53. Bax actúa como proteína promotora del daño celular, a diferencia de Bcl-2, que es antiapoptótica (120). Bax es capaz de anular el efecto antiapoptótico de Bcl-2 (134), acelerando la apoptosis en ausencia de factores de crecimiento -lo que desencadena dicho proceso-, por interacción proteína-proteína a través

de los dominios BH1 y BH2, neutralizando así el efecto antiapoptótico de la proteína Bcl-2. (134,135,136).

Por otro lado, existe otra proteína muy importante en el proceso de apoptosis, denominada Bad, que es copartícipe de la liberación de Bax. Además, otras proteínas son copartícipes en proceso de apoptosis, como Bak, que junto a proteínas como BAG-1 son capaces de interactuar con Bcl-2 (138), jugando un papel reseñable junto a la ya reseñada oncoproteína Bcl-2 en el proceso de apoptosis.

Se ha visto que el factor de necrosis tumoral β es capaz de inhibir la expresión de Bcl-2, y ésta parece ser la vía por la que puede inducir apoptosis (139). En la apoptosis existen proteínas agonistas y antagonistas para Bcl-2.

Entre los inductores de apoptosis destacan las siguientes proteínas: Bax -antagonista de Bcl-2-, Bcl-X_S -antagonista Bcl-X_L-, Bak -antagonista de Bcl-2 y Bcl X_L-, Bik y Bad (135), -ambos antagonistas de Bcl X_L. Entre las proteínas con efectos represores de la apoptosis destacan las siguientes: Bcl-2 -antagonista de Bax-, Bcl-X_L -antagonista de Bcl-X_S-, Mcl-1 -antagonista de Bax- (137).

Se ha visto que en la ejecución de apoptosis es especialmente importante la proteína BAG-1 y el binomio Bcl-2/Bax; ya que BAG-1 contacta entre si proteínas implicadas en la apoptosis para degradar Bax por la acción de un proteasoma (140).

Bcl-2 actúa como antiapoptótica en determinados tipos celulares, incluido el sistema inmune (124), dependiendo de los niveles existentes de BAG-1; además BAG-1 podría actuar conjuntamente con otras proteínas antiapoptóticas, como Bcl-X_L o con el producto del gen *ced 9* (141). BAG-1 presenta una región rica en ubiquitinas, muy conservada, que se unen covalentemente a diversas proteínas, para facilitar su degradación proteolítica (140).

Parece ser que otra de las funciones de dichas ubiquitinas, es hacer reconocibles por las proteasas a ciertas proteínas diana; así BAG-1 podría unirse a Bcl-2, o a otras proteínas unidas a Bcl-2, en contacto con un proteasoma que participa en la regulación de la apoptosis celular (138).

La heterodimerización se lleva a cabo a través de las regiones de homología BH1 y BH2 y la región amino terminal de Bcl-2, siendo necesaria para su heterodimerización con Bax (136,137).

Se han realizado estudios donde se vio el papel antiapoptótico de BAG-1, mediante transfección de su gen en fibroblastos sometidos a determinados estímulos inductores de apoptosis, produciéndose un efecto represor menor que el ejercido por Bcl-2.

No obstante, la co-transfección de BAG-1 y Bcl-2 duplicó la protección que ejercía Bcl-2 ante anticuerpos anti-Fas en linfocitos citotóxicos, de ahí la importancia del estudio de BAG-1 en la apoptosis.

La investigación del intensificador del gen Bax ha permitido identificar cuatro sitios homólogos a las secuencias consenso de unión de p53. Existe también una región de homología, denominada BH3, situada en la porción central de la molécula de Bax y Bak, que es esencial y suficiente para la heterodimerización con Bcl-2 y Bcl-X_L, respectivamente (137,142).

También existe relación entre la expresión de Bax y Bcl-2 en células sometidas a irradiación en relación a la proteína p53. La irradiación de diversos tipos celulares, permite observar una inducción rápida de los niveles de mRNA de GADD45 y de Bax en las células normales, con respecto a células carentes de p53 funcional. A diferencia de GADD45 y otros genes, Bax solo se induce en las células normales en las que se consigue apoptosis tras la irradiación, aunque en todas ellas se ve descenso del mRNA de Bcl-2 y aumento de p53 (46).

Los ratones genéticamente privados de la expresión de Bcl-2 son viables, pero mueren hacia la 3ª semana de edad, con riñones poliquísticos, hipopigmentación del pelo y desaparición fulminante del sistema linfóide, siendo más sensibles los linfocitos a la muerte por glucocorticoides o por radiación gamma (143,144).

Por su parte, los ratones genéticamente privados de la expresión de Bcl-X no son viables y mueren al 13^{er} día de gestación, con apoptosis neuronal masiva en cere-

bro, médula y ganglios, hígado, y células hematopoyéticas.

Bcl-x mantiene la viabilidad de células inmaduras durante el desarrollo de los sistemas nervioso y hematopoyético; en tanto que Bcl-2 actúa durante la diferenciación de estirpes linfoides del sistema inmune (143).

Los ratones genéticamente deprivados de Bax muestran también aberraciones específicas de la apoptosis, específicas de linaje celular, especialmente patentes en linfocitos T y B, con hiperplasia de células de la granulosa del ovario.

Mecanismo de acción apoptótica por proteasas específicas

La proteólisis que ocurre durante la apoptosis es llevada a cabo por proteasas específicas denominadas ICE -*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*-, purificada de células de mamíferos y también es producida por monocitos ante diversos estímulos proinflamatorios (145).

ICE es una cisteína proteasa, muy conservada -idéntica casi al producto del gen *ced-3* en otros organismos, como el nemátodo *C.elegans*- y con poca homología con respecto a la superfamilia de las papainas, sobre todo en residuos de Asp próximos a residuos hidrofóbicos (146). ICE está compuesta por dos subunidades p20 y p10, siendo ambas imprescindibles para su actividad, que es inhibida por reserpinas. Su sitio catalítico reside en una Cys 287, dado que una mutación en dicho residuo aminoacídico anula

completamente la función enzimática (147).

Se vio por mutagénesis y difracción de rayos X que el sustrato se une entre estas dos subunidades y que ambas se asocian formando un heterotetrámero (147) [(p20)₂ (p10)₂], en el que la subunidad p10 de una molécula se sitúa frente a la subunidad p20 de la otra, para formar entre ambas un sitio activo, que favorece la autocatálisis y su regulación. Además se ha identificado Mch 2 como un nuevo miembro de la familia de proteasas ICE (148, 149, 150, 151).

ICE por activación autoproteolítica se puede regular alostéricamente a través de p10/p10, como confirman los estudios de complementación entre mutantes y la completa inhibición de la actividad enzimática si se produce una mutación en el residuo cisteínico de la región catalítica.

Mecanismo de acción a través de cisteínas proteasas

Se ha aislado y clonado en cerebro humano, un gen denominado Ich-1 (*ICE and ced-3 homolog-1*), similar al gen murino *nedd-2*, miembro de la familia ICE/Ced-3 e inductor de apoptosis, y que puede inhibirse por Bcl-2 (152, 153).

ICE, por splicing alternativo, da lugar a dos proteínas funcionalmente diferentes, ICH-1₁ (de 435 aminoácidos), cuya hiperexpresión induce la apoptosis la cual se evita con Bcl-2 (152) y ICH-1, que suprime la apoptosis inducida por depri-

vación de suero en cultivos de fibroblastos (149)

La secuencia deducida de Ich-1₁ se parece todavía más a la de Ced-3 que a la de ICE. El hecho de que ICH-1 e ICE coexistan en las mismas células sugiere que la ejecución de la apoptosis puede deberse a la acción conjunta de varios miembros de la familia ICE/Ced-3 (152).

Todas estas enzimas (ICE, Ich-1/Nedd-2 o ICE rel II/TX/Ich-2 y Mch-2) son capaces de escindir la enzima PARP -Poli-ADP ribosa polimerasa- (153,154,155,156).

Se ha identificado en cultivos de gránulos cerebelares por hibridación histoquímica una proteasa (IRP) que se expresa en diversos tejidos: corazón, cerebro, hígado, testículos, entre otros, capaz de inducir apoptosis en cultivos. IRP tiene una gran homología en la secuencia de aminoácidos respecto a la proteína CPP32 humana (154).

CPP32b en forma activa está constituida por las proteínas p17 y p12, homólogas de las subunidades p20 y p10 de ICE, respectivamente (153). La diferencia esencial con ICE, al igual que ocurre con otras cisteínas proteasas, radica en la región de reconocimiento del sustrato, siendo los sitios de unión a Asp (sitios P1) idénticos, mientras que las regiones P2, P3 y P4 son específicas de sustrato; hecho crucial para su acción biológica y su especificidad. (149,155).

Sustratos de la apoptosis

Se ha asociado las alteraciones nucleares y la activación de las en-

donucleasas como la característica más esencial de la apoptosis, siendo la apoptosis un proceso que tiene lugar en el núcleo y en el citoplasma, con localización extranuclear de Bcl-2, y de las proteasas ejecutoras de apoptosis (155), evitándose ésta si se utilizan inhibidores de las proteasas ICE.

ICE es capaz también de escindir la enzima poli (ADP ribosa)-polimerasa -PARP- (156) necesaria para la vigilancia de la integridad del genoma y la iniciación de la reparación del DNA. Además, se ha visto que la activación de la nucleasa internucleosómica, parece regularse negativamente por poli-ADP-ribosilación (157).

En cuanto a la activación de las endonucleasas, además de la ya reseñada regulación negativa poli-ADP-ribosilación, la activación podría ser mediada a través de una proteinasa de 24 KD, que se encuentra 10 veces sobreexpresada en células apoptóticas, con fragmentación internucleosomal característica del DNA en múltiplos de 180 pares de bases. En linfocitos citotóxicos se inducen también niveles de DNAasa I y DNAasa II. Se ha visto que durante la apoptosis se escinde proteolíticamente la ribonucleoproteína U1 (U1, 70 KDa) por depleción de nutrientes, produciendo un fragmento de 40 KDa por la acción de una cisteína proteinasa (Asp 229) (158).

Citoesqueleto y apoptosis

Durante la apoptosis se produce una degradación de la estructura laminar que reviste la cara interna

de la membrana nuclear, degradándose las lamininas A, B, y C (159), por proteasas específicas de la familia *PrICE/ CPP32/Yama/Apopaína*, implicadas en la integridad de dicha membrana nuclear.

La utilización de inhibidores específicos de la proteasa que escinde las láminas, no impidió sin embargo la degradación oligonucleosómica característica del DNA, pero si bloquea la ruptura nuclear y el empaquetamiento de la cromatina condensada en cuerpos apoptóticos característicos de la fase final de apoptosis, siendo la fosfatidilserina un marcador de membrana característico de apoptosis (161).

Se ha implicado a sustratos del citoesqueleto y de la membrana celular en el proceso de formación de cuerpos apoptóticos -entre ellas la actina β - (157), degradándose las actinas por proteasas ICE o similares.

La activación por proteólisis activa una proteína reguladora denominada Gas-2, que produce retracción y colapso de la membrana amular por alteración de la actina (162). Dicha retracción se ve favorecida durante la apoptosis por la fodrina -espectrina no eritrocítica- (160), que se une a los monómeros de (160) actina, la cual es también escindida. La fodrina es activada por calpaína, culminándose así la apoptosis originada por otras cisteínas proteasas (159). Así, en linfocitos T citotóxicos la vía de señalización directa es mediada por el sistema Fas (163).

Como ejemplo de vías de apoptosis tomaremos el Sistema Fas/AOP-I/CD95 de señalización apoptótica en linfocitos, que representa una vía de transducción apoptótica.

Sistema Fas/AOP-I/CD95: señalización apoptótica en linfocitos

El sistema Fas/AOP 1/CD95 se descubrió en células de linfoma B utilizando como inmunógeno en ratones atímicos (164). Tras clonarlos, se comprobó que estos dos antígenos eran miembros de la superfamilia de los receptores de membrana de los factores de necrosis tumoral y de crecimiento nervioso (NGF) (165).

La homología entre los miembros de la familia se da en la región extracelular, excepto en el caso de Fas y de TNF-R1, cuya homología se da en la región estructural intracitoplasmática, sobre todo en una región de 70 aminoácidos muy conservada, que carece de dominios de señalización pero que es necesaria y suficiente para la transducción de las señales apoptóticas, denominándose la región de muerte (166,167).

Fas también tiene una corta región de aminoácidos en su extremo carboxílico (15 aminoácidos), ausente en TNF-R1, con función reguladora negativa. FasL (168), ligando específico de Fas, es una proteína de membrana de tipo II, siendo la interacción con su receptor de tipo yuxtacrino, con una estructura extracelular homóloga al TNF (164,166,169).

Fas se expresa en muchos tejidos: timo, hígado, corazón, pulmón,

rión, ovario y en linfocitos maduros, cuya activación estimula aún más la expresión de Fas, al igual que ocurre en los linfocitos transformados por virus (HTLV-1, HIV, EBV) y linfomas. En linfocitos T periféricos la expresión de Fas es clave para la apoptosis por mecanismos autocrinos y paracrinos. Se ha comprobado que el sistema Fas/ FasL es operativo en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a través de TNF α , a través de FasL (170,171).

La señalización apoptótica, tanto de Fas como de TNF- α comienza con la estimulación y probable trimerización del receptor Fas, por su interacción con FasL, trímero en solución, (171). TNF puede inducir apoptosis y necrosis (169), existiendo una gran semejanza entre los receptores TNF-R1 y Fas, especialmente en su dominio de muerte. Incluso la muerte inducida por TNF-R1 es más lenta que la inducida por Fas (172).

Así, cuando se incuban células portadoras de Fas con anticuerpos contra Fas, inmediatamente se detecta actividad esfingomielasa y aumento de la ceramida, mediadores del proceso apoptótico, produciéndose fosforilaciones por la actividad tirosina quinasa, que son comunes en las vías apoptóticas inducidas por Fas y TNF (173).

En el caso de TNF-R1 se activa una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina, con producción de DAG (diacilglicerol) (174,175), que a su vez activa la esfingomielasa ácida, que desdobra la esfingosona a ceramida, activando ésta última una se-

rina-treonina quinasa (176,177; 178,179).

En la necrosis, la reestimulación de TNF-R1 da siempre lugar a la activación del factor nuclear kappa B (NF-KB), regulador de los mecanismos de defensa e inflamación, hecho que no ocurre en el caso de Fas (174).

La inhibición de la fosfolipasa C impediría la muerte celular por necrosis en el caso de TNF-R1, pero no en el caso de Fas, cuyo mecanismo apoptótico no se afecta indicando una vía de señalización más corta para éste (176). La estimulación de las fosfolipasas C o D activa la proteína quinasa C (zeta), a través de DAG y la estimulación de ésta, por vía directa con ésteres de forbol reduce la citotoxicidad por Fas. Esta quinasa media la inactivación de Ik-B α inhibidor de NF-kB (181), que se activaría con el aumento de la ceramida, pero se inhibiría por un aumento mucho menor de ésta (180, 181).

Influencia de factor de transcripción NF-KB en la apoptosis

NF-KB podría ser un importante regulador de la apoptosis. Se trata de una familia de factores de transcripción, Rel/NF-KB, (182) que funciona en la inducción de una gran variedad de genes celulares, entre ellos las citoquinas, implicados en respuestas de inmunidad (183), en el estrés oxidativo y en la glia (184).

La familia consta de dos miembros, homólogos del oncogen v-rel,

del virus de la reticulosis aviar, que incluyen, por un lado las proteínas precursoras, p105 y p100, que se activan por proteólisis en p50 (p50/p105, NF-KB1) y p52 (p52/p100, NF-KB 2); y por otro lado, el proto-oncogen c-rel, p65 (Rel A) y Rel B, en los vertebrados y Dif/Cif en *Drosophila* (182,185).

La proteína p65 actúa como un potente activador de la transcripción debido a sus dominios de transactivación, mientras que tanto p50 como p52 carecen de dichos dominios (186), interaccionando Bcl-3 con ambos, ya que Bcl-3 está implicado en la interacción con NF-KB (187), debido a que codifica una proteína nuclear que puede alterar la localización de la proteína NF-KB. (188).

Así los embriones de ratas deficientes en p65 (Rel A) no superan generalmente los 15 días de gestación y su muerte se acompaña de una masiva apoptosis hepática (189), ya que la carencia de Rel A origina prácticamente sólo homodímeros p50/p50, represores de Bcl-2. Además, la expresión de p65 activa la transcripción del promotor; mientras que la expresión de p50 la reprime.

Por otro lado, se ha visto que la proteína Bcl-3, reguladora del ciclo celular, es capaz de regular la transactivación de NF-KB (190) y también está implicado en el control del ciclo celular (191).

Se ha descrito la presencia de tres motivos estructurales alternativos reconocibles por NF-KB en los promotores alternativos del gen

Bcl-2, aunque solamente uno de ellos, p2, es capaz de unirse específicamente con p50 (NF-KB 1) y p65 (Rel A), regulando de esta manera la transcripción basal (192)

Se ha visto que en tejidos resistentes a la apoptosis, mediada por Fas, existe una sobreexpresión de la tirosina fosfatasa FAP-1, anclada a la membrana, y asociada con Fas (193) en la región de 15 aminoácidos del terminal carboxílico, sin homología en TNF-R1, definida como de regulación negativa. Existen otras proteínas, TRADD (194), MORT1/FADD (195,196) e IRP (154) con un dominio de muerte también semejante a su dominio catalítico. TRADD se une con TNF-R1, FADD con Fas exclusivamente, mientras que IRP lo hace fundamentalmente con Fas y más debilmente con TNF-R1 (195).

La hiperexpresión transitoria experimental de cualquiera de ellos, induce la muerte celular por apoptosis. TRADD presenta un dominio homólogo de muerte, similar al de TNF-R1 y un dominio de activación de NF-KB, anulando mutaciones en IRP la capacidad de inducir apoptosis, modulada por su otro dominio con características de proteína quinasas. Se ha visto que las regiones citoplasmáticas de Bcl-2 y TNF-R1 son capaces de hetero-oligomerización (195).

Se ha observado que la apoptosis inducida por Fas y TNF vía proteína-proteasas es impedida por *crmA*, sugiriendo que ICE u otra proteína proteínasa de la familia, también inhibida, es la enzima ejecutora. (197)

Aunque exista cierta divergencia al comienzo de la señalización, la apoptosis inducida por TNF-R1 y Fas convergen al final con la activación de ICE o de una cisteína proteasa muy similar (197). La hiperexpresión transitoria de TRADD, activa NF-KB de forma muy potente en diversas líneas celulares que responden a TNF- α ; de tal manera que la activación de NF-KB se debe únicamente a la transducción de la señal de TNF-R1 y no depende de la liberación de ICE. (196,197). Sin embargo, en el caso de Fas parece que ICE debe ser esencial para la apoptosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHWARTZMAN R.A., CID-LOWSKI J.A.: Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 1993; 14: 133-151.
2. OPPENHEIM R.W.: Naturally occurring cell death during neural development. *Trends Neurosci* 1985; 8: 487-493.
3. VEIS D.J., SORENSON., SHUTTER J.R., KORSMEYER.: Bcl-2 deficient mice. demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75: 229-240.
4. BARINAGA M.: Forging a path to cell death.. *Science* 1996; 273: 735-737.
5. WYLIE.: The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Gen* 1995; 5: 97-104.
6. KROEMER G., PETIT P., ZAMZAMI N.: The biochemistry of programmed cell death.. *The FASEB J.* 1995; 9: 1277-1287.
7. WHITE E.: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gen Develop* 1996; 10:1-15.
8. ALEX AND BAKER.: p53 gene mutations occur in combination with 17 p allelic deletions in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51:4436-4442.
9. BAKER. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wildtype p53. *Science* 1991b; 249:912-15.
10. GOH H.S., CHAN C.S., KHINE K., D.R SMITH.: P53 y comportamiento del cáncer colorectal. *The Lancet* 1994; 25(6):376-377.
11. VOJTESEK B., BARTEK J., MIDGLEY C.A., AND LANE D.P.: An immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. *J. of Immunological Methods* 1992; 151: 237-244.
12. PICKSLEY¹ S.M., AND LANE D.P.: p53 and Rb: their cellular roles. *Current Opinion in Cell Biology* 1994; 6: 853-858.
13. HAFFNER H.: Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 84-90.
14. PAN H., GRIEP A.P.: Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 or E7 transgenic mice. Implications for tumor suppressor gene function in de-

- velopment. *Genes Dev.* 1994; Jun 1; 8:11, 1285-1289.
15. PIETENPOL J.A., TOKINO T., THIAGALINGAM S., EL-DEIRY W., KINZLER K., VOGELSTEIN B.: Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 1998-2002.
 16. LIN J., CHEN J., ELENBBAS B., LEVINE A.J.: Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to Mdm-2, and the adenovirus 5 E1B 55-KD protein. *Genes Dev* 1994; 8:1235-1246.
 17. BARAK Y., JUVEN T., HAFNER R., OREN M.: MDM 2 expression is induced by wild-type activity. *EMBO, J.*, 1993; 12: 461-468.
 18. OLINER J.D., PIETEMPOL J.A., THIAGALINGAM S., GYURIS J., KINZLER K.W.: Oncoprotein MDM2 conceals the activation, binding to MDM2 and the adenovirus 5 E1B 55-Kd protein. *Nature* 1994; 362: 857-860.
 19. DEBBAS M. Aand WHITE E.: Wild-type mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993; 7: 546-554.
 20. CLORE G., OMICHINSKI J.G., SAKAGUCHI K., ZAMBRANO N., SAKAMOTO H., APELLA E., GRONEBORN A.M.: High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multiple-dimensional NMR. *Science* 1994; 265: 386-391
 21. ENOCH T., NORBURY C.: Cellular responses to DNA damage: cell cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *TIBS* 1995; 20: 426-430
 22. LOWE S.W., BODIS S., MACCLATLEY A.: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 82: 685-687.
 23. CANMAN C.F., GILMER T.M., COUNTS B., KASMAN M.N.: Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev* 1995; 9: 600-611.
 24. KASTAN M.B., ONYKWERE O., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., CRAIG R.W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1995; 51: 6304-6311.
 25. FISHER D.E.: Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78: 539-542.
 26. COUNTER M.D., AVILION A.A., LEFEUVRE C.E., ET AL.: Telomere shortening associated with chromosomal instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11:1921-1929.
 27. MOLLER J., ESTEVE J., RENART H. Cancer in the European Community and its member states. *Eur. J. Cancer* 1990; 26: 1167-1256.
 28. MELING G.I., LOTHE R.A., BORRESEN AL., ET AL.: The

- p53 tumor suppressor gene in a colorectal carcinomas II: relation to DNA ploidy pattern and clinicopathological variables. *Br. J. Cancer* 1993; 67:93-98.
29. ADAMI G.R., WEI N., KEYO-MARSI K., AND ELLEDGE S.J.: The p21 Cdk-interacting protein CIP1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75:805-816
30. DENG C., ZHANG P., HARPER J.W., ELLEDGE S., LEDER P.: Mice lacking p21 CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoints control. *Cell* 1995; 82:675-684.
31. EL-DEIRY W.S., TOKINA T., VELCULESKU V.E., LEVY D.B., PARSONS R., TRENT J.M., LIND D., MERCER W.E., KINZLER K., AND VOGELSTEIN B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817-825.
32. PARKER S.B., EICHELE G., ZHANG P., RAWLS A., SANDS A.T., BRADLEY A., OLSON E.N., HARPER J.W., ELLEDGE S.J.: p53-independent expression of p21^{Cip1} in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995; 267:1024-1027.
33. LANE D.P: p53 and human cancers. *Br. Med. Bull.*, 1994 b; 50:582-589.
34. GUILLOUF C., GRANA X., SELVAKUMARAN M., DE LUCA A., GIORDANO A., HOFFMAN B., LIEBERMANN D.A.: Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53 induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 1995; 85:2691-2698.
35. SMITH M.L., CHEN I.T., ZHAN G., BAE Y., CHEN C.Y., GILMER T.M., KASTAN M.B., O'CONNOR P.M., FORMACE A.J. Interaction of the p53-regulated protein GADD 45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994; 266:1376-1380.
36. HOLSTEIN M., VOGELSTEIN.: P53 Mutations in human cancer. *Science* 1991; 253: 49-53.
37. JACKS T., REMINGTON L., WILLIAMS B.O, SCHMITT E.M., HARACHMI S., BRONSON R.T., and WEINBERG R.A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994; 4:1-7.
38. LOWE S.W.: Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 1995; 7:547-553.
39. GARRET L.Y., HAAS-KOGAN D.A., VIDAIR C.A., HAAS M., DEWEY W.C., ISMAEL M.A.: Cell cycle synchrony unmasks the influence of p53 function on radiosensitivity of Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 1996; 56: 500-506.
40. LEE J.M., BERSTEIN A.: p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5742-5746.
41. BRUGAROLAS J., CHANDRA-SEKARAN C., GORDON J.Y., BEACH D., JACKS T., HANNON

- G.: Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; 377: 552-557.
42. DULIC V., KAUFMANN W.K., WILSON S.J., TLSTY T.D., LEES E., HARPER J.W., ELLEDGE J.W., REED S.I.: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblast during radiation -induced G1 arrest. *Cell* 1994; 76:1013-1023.
 43. MACILWRATH A.J., VASEY P.A., ROSS G.M., BROWN. Cell cycle arrest and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; 54:3718-3722.
 44. NELSON W.G., KASTAN M.B.: DNA stran breaks: the DNA template alterations that tigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14:1815-1823.
 45. ZHAN Q.: Induction bax by genotoxic stress in human cells correlate with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; 9: 3743-3751.
 46. ZHAN Q., BAE I., KASTAN M.B., FORNACE A.J., Jr.: The p53-dependent ray response of GADD45. *Cancer Res* 1994 b; 54:2755-2760.
 47. ZHU Y.M., BRADBURY D.A., RUSSELL N.H.: Wild type p53 is required for apoptosis induced by growth factor deprivation in factor-dependent leukemic cells. *Br J Cancer* 1994; 69:468-472.
 48. NAGASAWA H., LI C., MAKI C.G., IMRICH A., LITTLE J.B.: Relationship between radiation-induced G1 phase arrest and p53 in human tumor cells. *Cancer Res* 1996; 55:1842-1846.
 49. LIN D., SHIELDS M.T., ULRICH S.J., APELLA E, MERCER W.E.: Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc Acad Sci USA* 1992; 89:9210-9214.
 50. EL-DEIRY W.S., HARPER J.W., O'CONNOR P.M., VELCULESCU V., CANMAN C.E., JACKMAN J., PIETEMPOL J., BURRELL M., HILL D.E., WIMAN K.G.: WAF1/CIP1 is induced in p53 mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 4:1169-1174.
 51. SOLOMON M.J.: Activation of the various cyclin/cdc 2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol* 1993; 73:1059-1065.
 52. BEIJERSBERGEN R.L., KERKHOVEN R.M., ZHI L., CARLLE L., VOORHOEVE M., BERNARDS.: E2F-4, a new member of the E2F gene family has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev* 1994; 8: 2680-2690.
 53. SHEER C.J.: G1 progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
 54. LIEBERMANN D.A., HOFFMAN B., STEINMAN R.: Molecular controls of growth arrest and apoptosis p53-dependent and

- independent pathways. *Oncogene* 1995; 11(1): 199-210.
55. HIRAI H., ROUSSEL M., KATO J.Y., ASHMUN R.A., SHEER C.J.: Novel INK4 proteins p19 and p18 are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases cdk4 and cdk6. *Mol Cell Biol* 1995; 15:2672-2681.
56. LUKAS J., BARTKOVA J., ROHDE M., STRAUSS M., BARKET J.: Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15:2600-2611.
57. WEINBERG R.A.: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81:323-330.
58. GUAN K.L., JENKINS C.W., NICHOLS M.A., O'KEEFE C.L., MATERA A.G., XIONG Y.: Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1} and p15^{INK4B/MTS2} related cdk6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1995; 7:2939-2952.
59. RAGIMOV N., KRAUSKOPF A., NAVOT N., ROTTER V., OREN M., ALONI Y., OREN M.: Wild type but not mutant p53 can repress transcription in vitro by interfering the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene* 1993; 8:1183-1193
60. CHEN J., JACKSON P.K., KIRSCHNER P.H., DUTTA A.: A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of CDK kinase and PCNA. *Nature* 1995; 374: 386-388
61. DUTTA A., RUPPERT J.M., AS-TER J.C., WINCHESTER E.: Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 1993; 365: 79-82.
62. SANCAR A.: Mechanism of DNA excision repair. *Science* 1994; 266:1954-1956.
63. GIBSON T.J., THOMSON J.D., BLOCKER A., KOUZARIDES T.: Evidence for a protein domain superfamily shared by cyclins, TBIIB and Rb/p107. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:946-952.
64. SAVITSKY K., BAR-SHIRA A., GILAD S.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268:1749-1753.
65. MALKIN D.: p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 66:83-92.
66. PURDIE C.A., HARRISON D.J., PETER A., DOBBIE L., WHITE S., HOWIE S.E.M., SALTER D.M., BIRD C.C., WYLLIE A.H., HOOPER M.L., and CLARKE A.R.: Tumor incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* 1994; 9:603-609.
67. LIVINGSTONE L.R., WHITE A., SPROUSE J., LIVANOS E., JACKS T., TLSTY T.D.: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992; 70:923-935.
68. MARIN L.A., SMITH C.E., LANGSTON M.Y., QUASHIE D., DILLEHAY L.E.: Response to glioblastoma cell lines to low

- dose rate irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21:397-402.
69. CHEN P., IAVARONE A., FICK J., EDWARDS M., PRADOS M., ISRAEL M.A.: Constitutional 53 mutations associated with brain tumors in young adults. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82:106-115.
 70. DAVIS M., MALCOLM S., RABBITSN T.H.: Chromosome translocations can occur on either side of the c-myc oncogene in Burkitt lymphoma cells. *Nature* 1984; 308:1272-1275
 71. JACKS T.: p53-dependent apoptosis by Rb deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 1994; 371:72-74
 72. JACKS T., FAZELLI A., SCHMITT E.T., BRONSON R.T., GOODELL M.A., WEINBERG R.A.: Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 1992; 359:295-300.
 73. HATAKEYAMA M., BRILL J.A., FINK G.R., WEINBERG R.A.: Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1994; 8:1759-1771.
 74. HENSEY C.E., HONG F., DURFEE T., QIAN Y.W., LEE E.Y.: Identification of discrete structural domains in the retinoblastoma protein Amino-terminal domain is required for its oligomerization. *J Biol Chem* 1994; 269:1380-1387.
 75. HAUPT Y., ROWAN S., OREN M.: p53 mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pBR. *Oncogene* 1995; 10:1563-1571.
 76. MORGENBESSER S., WILLIAMS B.O., JACKS T., DePHINO R.A.: p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 1994; 371:72-74.
 77. ALMASAN T.E., YIN Y., LEE E.Y., BRADLEY A., LI W., BERTINO J.R., WAHL G.: Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry activation of E2f-responsive genes, and apoptosis. *Proc Acad Sci USA* 1995; 92:5436-5440.
 78. WU X., LEVINE A.: p53 and E2F1 cooperate to mediate apoptosis. *proc. Natl Acad Sci USA* 1994; 92:1357-1361.
 79. OREN M.: Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Sem Cancer Biol* 1994; 5:221-227.
 80. LEE E.Y., CHANG C.Y., HU N., WANG J., LAI C.C., HERRUP K., LEE W.H., BRADLEY A.: Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis. *Nature* 1992; 359:288-294.
 81. PAGANO M., THEODORAS A.M., TAM S.W., DRAETTA G.: Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicate DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev* 1994; 8:1627-1639.
 82. JIANG W., KAHN S.M., ZHOU P., ZHANG Y.J., CACACE A.M., INFANTE A.S., DOI S., SANTILLA R.M., WEINSTEIN I.B.:

- Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 1993; 8: 3447-3457.
83. BELJERSBERGEN R.L., KERKHOVEN R.M., ZHU L., CARLLE L., VOORHOEVE M., BERNARDS R.: E2F-4, a new member of the E2F gene family has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Gene Dev* 1994; 8:2680-2690.
84. HINDS P.W., DOWDY S.F., EATON E.N., ARNOLD A., WEINBERG R.A.: Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1994; 91:709-713.
85. WINSTON K., PLEDGER W.: Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and independent mechanisms. *Mol Biol Cell* 1993; 4:1133-1144.
86. WONG K., XIONG Y., BEACH D., GILMAN M.: Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblast. *Exp Gerontol* 1996; 31(1-2): 311-325.
87. HARRINGTON E.A., FANIDI A., EVAN G.I.: Oncogenes and cell death. *Curr Opin Gen Dev* 1994; 4:120-129.
88. ESTUS S., ZAKS W.J., FREEMAN R.S., GRUDA M., BRAVO R., JOHNSON E.M., Jr.: Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 6:1717-1727.
89. HIRAI H., ROUSSEL M., KATO J.Y., ASHMUN R.A., SHERR C.J.M.: Novel INK4 proteins p19 and p18 are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases cdk4 and cdk6. *Mol Cell Biol* 1995; 2672-2681.
90. POLIAK K., KATO M., SOLOMON M.J., SHERR C.J., MASSAGUE J., ROBERTS J.M., KOFF A.: p27^{kip1} and cyclin D-Cdk4 are interacting regulators of Cdk2, and link TGF- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22.
91. TOYOSHIMA H., HUNTER T.: p27, a novel inhibitor of G1-cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78:67-74.
92. MATSUSHINE H., QUELLE D.E., SHUELEFF S.A., SHIBUYA S.A., SHERR C.J., KATO J.Y.: D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14:2066-2077.
93. MEYERSON M., HARLOW E.: Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 1994; 14:2066-2076.
94. EWEN M.E., SLUSS H.K., SHERR C.J., MATSUSHINE H., KATO J.Y., LIVINSTON D.M.: Functional interaction of the retinoblastoma protein with mammalian D-types cyclins. *Cell* 1993; 73:487-499.

95. GOODRICH D.W., VAIRO G., CHITTENDEN T., QUIAN Y.W., LEE E.Y., LEE W.H.: The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; 67:293-302.
96. CLARKE A.R., ROBANUS-MAADANG E., VON ROON M., VAN DER LUGT N.M.T, VAN DER VALK M., HOOPER M., BERNS A., RIELE H.: Requirement for a functional RB1 gene in murine development. *Nature* 1992; 359:328-330.
97. SERRANO M., HANNON G., BEACH D.: A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk 4. *Nature* 1993; 366:704-707.
98. QUELLE D.E., ASHMUN R.A., SHURTLIFF S.E., KATO J.Y., BAR-SAGI D., ROUSSEL M., SHERR C.J.: Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 1993; 7:1559-1571.
99. BODRUG S.E., WARNER B.J., BATH M.L., LINDEMAN G.J., HARRIS A.W., and ADAMS J.M.: Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J* 1994; 13:2124-2130.
100. KRANENBURG O., VAN DER EB A.J., ZANTEMA A.: Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 1996; 15(1): 46-54.
101. WANG.: Wildtype receptor p53-triggered apoptosis is inhibited by Bcl-2 in a v-myc -induced cell T lymphoma line. *Oncogene* 1993; 8:3427-3431.
102. HARRINGTON E.A., FANIDI A., EVAN A., EVAN G.I.: Oncogenes and cell death. *Curr Opin Dev* 1994; 4:120-129.
103. HARRINGTON E.A., BENNET M.R., FANIDI A., EVAN G.L.: c-myc mediated apoptosis in fibroblasts is blocked by specific cytokines. *EMBO J* 1994; 13: 3286-3295.
104. GOTTLIEB E., HOFFNER R., VON RUDEN T., WAGNER E.F., OREN M.: Down regulation of wildtype p53 activity interferes with apoptosis of Il-3 dependent hematopoietic cell following Il-3 withdrawal. *EMBO J* 1994; 13:1368-1374.
105. HERMEKING H., EICK D.: Mediation of c-Myc induced apoptosis by p53. *Science* 1994; 265:2091-2093.
106. EVAN G.I., WYLIE A.H., GILBERT C.S., LITTLEWOOD T.D., LAND H., BROOKS M., WATERS C.M., PENN L.Z., HANCOCK D.C.: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein. *Cell* 1992; 69:119-128.
107. SHAN B., LEE W.H.: Derregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Science* 1994; 14:8166-8173.
108. MIYASITA T., REED J.C.: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the

- human Bax gene. *Cell* 1995; 80:293-299.
109. OLTVAI Z.N., MILIMAN C.L., KORSMEYER S.J.: Bcl-2 heterodimerizes with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
110. HARIGAI J.: Identification of a p53 dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; 54:3131-3135.
111. SIEGEL R.M., KATSUMATA M., MIYASHITA T., LOUIE D.C., GREENE M.I., REED J.C.: Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in Bcl-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7003-7007.
112. TSUJIMOTO Y., CROCE C.M.: Analysis of the structure, transcripts and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5214-5218.
113. MERINO, DING L., VEIS D.J., KORSMEYER S.J., NUNEZ G.: Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13:683-691.
114. LINETTE G.P., GRUSBY M.J., HEDRICK S.M., GLIMCHER L.H., KORSMEYER S.J.: Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8⁺ stage during positive selection and promotes differentiation at several control points. *Immunity* 1994; 1: 197-205.
115. BARRES B.A., HART I.K., COLES H.S.R., BURNE J.F., VOJVODIC J.T., RICHARDSON W.D., RAFF M.C.: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; 70:31-46.
116. ALLSOPP T.E., WYATT S., PATERSON H.F., DAVIES A.M.: The proto-oncogene Bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993; 73:295-307.
117. GARCIA I., MARTINO I., TSUJIMOTO Y., MARTINPU J.C.: Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the Bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258:302-304.
118. SNIDER W.D.: Functions of the neurotrophins during nervous system development. What the knockouts are teaching us. *Cell* 1994; 77:627-638.
119. MERRY D.E., VEIS D., HICK- EYW.F., KORSMEYER S.J.: Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 1994; 120:301-311.
120. MIYASHITA T., KRAJEWSKI S., KRAJESKA M., WANG H.G., LIN N.K., LIEBERMANN D.A., HOFFMAN B., REED J.C.: Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 1994b; 9: 1799-1805.
121. PEREGO P., GIAROLA M., RIGHETTI S.C., SUPINO R.,

- CASERINI C., DELIA D., PIEROTTI M.A., MIYASHITA T., REED J.C., ZUNINO F.: Association between Cisplatin Resistance and mutation of p53 gene and reduced Bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 1996; 56: 556-562.
122. KANE D.J., ORD T., ANTON R., BREDESEN D.E.: Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neuronal cell death. *J Neurosci Res* 1995; 40: 269-275.
123. CRUMRINE R.C., THOMAS A.L., MORGAN P.F.: Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Folw Metab* 1994; 14:887-891.
124. TORIGOE T., MILLAN J.A., TAKAYAMA S., REED J.C.: Bcl-2 inhibits T-cell-mediated cytolysis of leukemia cell lines. *Cancer Res* 1994; 54:48512-4854.
125. TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C.M.: Involvement of Bcl-2 gene human in the follicular lymphoma. *Science* 1985; 228:1440-1443.
126. BOYD J.M., MALSTROM S., SUBRAMANIAN T., VENKATESH L.K., SCHAEFER U., ELANGO VAN B., EIPER C.: Adenovirus E1B 19 Kda and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 1994; 79:341-352.
127. SHIMIZU S., EGUCHI Y., KOSAKA H., KAMIKE W., MATSUDA H., TSUJIMOTO Y.: Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 1995; 374:811-813.
128. KANE D.J., SARAFIAN T.A., ANTON R., HAHN H., GARLIA E.B., SELVERSTONE J., ORD T., BREDESEN D.E.: Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262:1274-1277.
129. JACOBSON M.D., RAFF M.C.: Programed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 1995; 374:811-813.
130. HOCKENBERY D.M., OLTVAJ Z.N., YIN X-M., MILLIMAN C.L., KORSMEYER S.J.: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75:241-251.
131. KRAJEWSKI S., TANAKA S., SCHIBIER M., FENTON W., REED J.C.: Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein. Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and other mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53:4701-4704.
132. LAM M., DUBYAK G., CHEN L., NUNEZ G., IRMLER M., SCHAEFER E., MARTINOU J.C., TSCHOPP J.: The protein Bcl-2a does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Bio* 1994; 126: 1059-1068.
133. BORNER C., MARTINOU Y., MATTMAN C., IRMLER M., SCHAEFER E., MARTINOU J.C., TSCHOPP J.: The protein Bcl-2a does not require mem-

- brane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 126:1059-1068.
134. YIN X.M., OLTVAY Z.N., KORSMEYER S.J.: BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369:321-323.
135. CITTENDEN T., FLEMINGTON C., HOUGHTON A.B., EBB R.G., GALLO G.J., ELANGOVAN B., CHINNADURAI G., LUTTZ R.J.: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995; 14:5589-5596.
136. TANAKA S., SAITO K., REED J.: Structure-function analysis of the apoptosis-suppressing Bcl-2 oncoprotein: substitution of a heterologous transmembrane domain restores function to truncated Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 1993; 268:10920-10926.
137. YANGE E., ZHA J., JOCKEL J., BOISE L.H., THOMPSON C.B., KORSMEYER S.J.: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80:285-291.
138. TAKAYAMA S., SATO T., KRAWESKY S., KOCKEL K., IRIE S., MILLAN J.A., REED J.C.: Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death apoptosis. *Cell* 1995; 80:279-284.
139. DUFFEY D., BILLINGS K., CALCATERRA T., WANG M., LINCHTENSTEIN A.: Pathways of apoptosis induced analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death apoptosis. *Cell* 1995; 80:279-284.
140. HOCKSTRASSER M.: Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:215-223.
141. VAUX D.L., WEISSMAN I.L., KIM S.K.: Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2. *Science* 1995; 258:1955-1957.
142. GALLO H.: Structure function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 1995; 270:11962-11969.
143. VEIS D., SENTMAN C.L., BACH E.A., KORSMEYER S.J.: Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 151:2546-2554.
144. CHAO D.T., LINETTE G.P., BOISE L.H., WHITE L.S., THOMPSON J.D., KORSMEYER S.J.: Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 1995; 182:821-828.
145. KOSTURA M.J., TOCCI M.J., LIMJUCO G., CHIN J., CAMERON P., HILLMAN A.G.,

- CHARTRAIN. N., SCHMIDT N.A.: Identification of a monocyte specific preinterleukin-1 b convertase activity. Proc Natl Acad Sci 1989; 86:5227-5231.
146. WILSON K.P., BLACK J.A.F., THOMSON J.A., KIM E.E., GRIFFITH J.P., NAVIA M.A., MURCKO M.A., CHAMBERS S.P., ALDAPE R.A., RAYBUCK S.A., LIVINGSTON D.J.: Structure and mechanism of interleukin-1B converting enzyme. Nature 1994; 370:270-275.
147. TALANIAN R.V., BRADY K.D., DANG L.C., BUMP N.J., FERENZ C.R., FRANKLIN S., GHAYUR T., HACKETT M.C., HAMMIL L.D., HERGOZ L., HUGUNIN M., HOUY W., MANKOVIC J.A., McGUINNESS L., ORLEWICZ E., PASKIND M., PRATT C.A., TRACEY D.E., KAMEN R., WONG W.W.: Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1b converting enzyme: A (p20/p10)₂ homodimer. Cell 1994; 78:343-352.
148. SLEATH P.R., HENDRICKSON R.C., KRONHEIM S.R., MARCH J.C., BLACK R.A., March J.C.: Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 b. J Biol Chem 1990; 265:14526-14528.
149. MIURA M., ZHU H., ROTELLO R., HARTWIEG E.A., YUAN J.: Induction of apoptosis in fibroblast by Il-b converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death. Cell 1993; 75:653-660.
150. FERNANDES-ALNEMERI T., LITWAK G., ALNNERI R.S.: CPP32, A novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin 1- b converting enzyme. J Biol Chem 1994; 55:2737-2742.
151. FERNANDES-ALNEMERI T., LITWAK G., ALNEMERI R.S.: Mch2 a new member of the apoptotic Ced-3/ICE cysteine protease gene famili. Cancer Res 1995; 55:2737-2742.
152. WANG L.: Ich-1 and Ice/ced-3 related genes encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell 1994; 78:739-750.
153. NICHOLSON D.W., ALI A., THORNBERRY N.A., VAILLANCOURT J.P., DING C.K., GALANT M., GAREAU Y., GRIFFIN P.R., LABELLE M., LAZEBNIK Y.A., RAJU S.M., SMULASUN M.E., YAMIN T.T., YU V.L., MILLER K.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 ptotease necessary for mammalian apoptosis. Nature 1995; 376:37-43.
154. BINHUI N., WU X., YANNSHENG D., YUAN S., HAMILTON-BYRD E., ROCKEY P.K., ROSTECK Jr., POIRIER-AND G., PAUL S.M.: Clonig and expression of a rat rat Brain ICE related protease IRP and its possible role in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. J Neurosci 1997; 17(5): 1561-1569.

155. JOHNSTON C.G., LI P., MANKOVICH J.A., TERRANOVA M., GHAYUR T.: Identification and characterization of ICH-2 a novel member of the interleukin -1B- converting family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 1995; 270: 15250-15256.
156. LAZEBNIK Y.A., KAUFMANN S.H., DESNOYERS S., POIRIER C.G.: Specific proteolytic cleavage of poli (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; 371:346-347.
157. WANG Z.Q., AUER B., STINGL L., BERGHAMMER H., HAIDACHER D., SCHWEIBER M., WAGNER W.F.: Mice lacking ADPRT and poli-ADP-ribosylation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 1995; 9: 509-520.
158. CASCIOLA-ROSEN L.A., MILLER D.K., ANHALT G.J., ROSEN A.: Specific cleavage of the 70-kDa protein component of small nuclear ribonucleoprotein is characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 1995; 269:30757-30760.
159. SQUIER M.K.T., MILLER A.C.K., MALKINSON A.M., COHEN J.J.: Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994; 159:229-237.
160. MARTIN S.J., O'BREIN G.A., NISHIOKA W.K., McGAHON A.J., MAHBOUI A., SAIDO T.C., GREEN D.R.: Proteolysis of fodrina (non erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 1995; 270:6425-6428.
161. MARTIN S.J., REULING-SPERGER C.P.M., McGAHON A.J., RADER J.A., VAN SCHIE R.C.A.A., LAFACE A.M., GREEN D.R.: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182:1545-1556.
162. BRANCOLINI C., BENEDETTI M., SCNEIDER C.: Microfilament reorganization during apoptosis: the role of the Gas 2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J* 1995; 14:5179-5190.
163. RATHMELL J.C., COOKE M.P., HO W.Y., GREIN J., TONWSEND S.E., DAVIS M.M., GOODNOW C.C.: CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺T cells. *Nature* 1995; 376:181-184.
164. DHEIN J., WALCZACK H., BAUMLER C., DEBATIN K.M., KRAMMER P.H.: Autocrine cell suicide mediated by APO-1/ (Fas/CD 95). *Nature* 1995; 373: 438-441.
165. OEHM A., BERHRMANN I., FALK W., PAWLITA M., MAIER G., KLAS G., LI-WEBER M., RICHARDS S., DHEIN J., TRAUTH B.C., PONSTINGL H., KRAMMER P.H.: Purification and molecular cloning of the

- APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. *J Biol Chem* 1992; 267: 10709-10715.
166. ITOH N., YONEHARA S., ISHII A., MIZUSHIMA S.I., SAMASHIMA M., HASE A., SETO Y., NAGATA S.: The polipeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66:223-243.
 167. TARTAGLIA L.A., AYRES T.A., WONG G.H.W., GOEDEL D.V.: A novel domain within the 55 Kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; 74:845-853.
 168. JU S.T., PANKA D.J., CUI H., ETTINGER R., EL-KHATIB M., SHERR D.H., STANGER B.Z., MARSHAK-ROTHSTEIN A.: Fas (CD 95)/Fas L interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; 373:444-448.
 169. LARRICK S., WRIGHT S.C.: Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J* 1990; 4:3215-3223.
 170. ITOH N., TSUJIMOTO Y., NAGATA S.: Effect of Bcl-2 on Fas-antigen-mediated cell death. *J Immunol* 1993; 151: 621-627.
 171. DHEIN J., DANIEL P.T., TRAUTH B.C., OEHM A., MOLLER P., KRAMMER P.H.: Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 1992; 3215-3223.
 172. CLEMENT M.V., STAMENKOVIC.: Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated death, similarities and distinctions. *J Exp Med* 1994; 180:557-567.
 173. SCULZE-OSTHOFF K., KRAMMER P.H., DROGE W.: Divergent signaling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J* 1994; 13:4587-4596.
 174. SCHULZE S., POTTHOFF K., MACHLEIDT T., BERKOVIC D., WIEGMAN K., KRONKE M.: TNF activates NF-KB by phosphatidylcholine-specific phospholipase D-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992; 71:765-776.
 175. CLEVELAND J.L., IHLE J.N.: Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell* 1995; 81:479-482.
 176. CIFONE M.G., DE MARIA R., RONCAIOLI P., RIPPO M.R., AZUMA M., LANIER L.L., SANTONI A., TESTI R.: Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo 1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Med Exp* 1994; 180: 1547-1552.
 177. HOLESNICK R., GOLDE D.W.: The sphingomyelin pathway in TNF and Il-1 signaling. *Cell* 1994; 77:325-328.
 178. MATHIAS S., DRESSLER K.A., KOLESNICK R.N.: Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by

- tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 1991; 266:10009-10013.
179. EISCHEM C.M., DICK C.J., LEIBSON P.J.: Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 1994; 153: 1947-1954.
180. MULLER G., AYOUD M., STORZ P., RENNECHE J., FABRO D., PFIZENMAIER K.: PKC-zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF- α bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1994; 13:2842-2848.
181. DIAZ-MECO M.T., DOMINGEZ I., SANZ L., DENT P., LORENZO J., MUNICIO M.M., BERRA E., HAY R.T., STURGILL T.W., MOSCAT J.: PKC-zeta induces phosphorylation and inactivation of I κ B- α in vitro. *J EMBO* 1994; 13: 2842-2848.
182. SIEBENLIST U., FRANZOSO G., BROWN K.: Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Biol* 1994; 10:405-455.
183. BAEUERLE P.A., HENKEL T.: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 12:141-179.
184. LUKE A.J., O'NEIL, KALTSCHMIDT.: NF- κ B: a crucial factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997; 20:252-258.
185. MARX J.: How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 1995; 270:232-235.
186. NOLAN G.P., FUJITA T., BHATTIA K., HUPPI C., LIU H.C., SCOTT M.L.: The Bcl-3 protooncogene encodes a nuclear I κ B molecule that preferentially interacts with NF- κ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1994; 13:3557-3566.
187. ZHANG Q., DIDONATO J.A., KARIN M., McKEITHAN T.W.: Bcl-3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular localization of NF- κ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1994; 14:3915-3926.
188. FRANZOSO G., BOURS V., PARK M., TOMIYAMA M., KELL K., SIEBENLIST U.: The candidate oncoprotein Bcl-3 is antagonist of p50/NF- κ B-mediated inhibition. *Nature* 1992; 359: 339-342.
189. BEG A.A., SHA W.C., BRONSON R.T., GHOST S., BALTIMORE D.: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the Rel A component of NF- κ B. *Nature* 1995; 376:167-170.
190. LEONARDO M.U.: Bcl-3 mediated nuclear regulation of the NF- κ B transactivating factor. *Immunol Today* 1994; 15:136-145.
191. OHNO H., TAKIMOTO G., McKEITHAN T.W.: The candidate protooncogene Bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cy-

- cle control. *Cell* 1990; 60:991-997.
192. PAYA M.P.: The transcription factor NF- κ B participates in the regulation of the Bcl-2 protooncogene. *Proc Am Ass Cancer Res* 1995; 36: 535- (Abstract 3189).
193. HSU H., XIONG J., GOEDDEEL.: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signal cell death and NF- κ B activation. *Cell* 1995; 81:495-504.
194. SATOT A., HANADA M., BODRUG S., IRIE S., IWAMA N., BOISE L.H., THOMPSON C.B., GOLEMIS E., FONG L., WANG H.G., REED J.C.: Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Acad Sci USA* 194; 91: 9238-9242.
195. BOLDIN M.P., VARFOLLO-MEEV E.E., PANCER Z., METT I.L., CAMONIS J.C., WALLACH.: A novel protein that interacts with the "death domain" of Fas/APO 1 contains a sequence otif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995; 270: 7795-7798.
196. CHINNAIYAN A.M., O'ROURKE K., TEWARI M., DIXIT V.M.: FASS a novel death-domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.
197. ENARY M., HUG H., NAGATA S.: Involvement of an ICE-like protease in Fas mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 78-81.