



**Universitat de Lleida**

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

**Identificació i caracterització dels executors  
de la mort cel·lular per isquèmia en els  
cardiomiòcits**

**Núria Bahi i Pla**

Lleida, 14 de Març de 2008

# Resultats

---

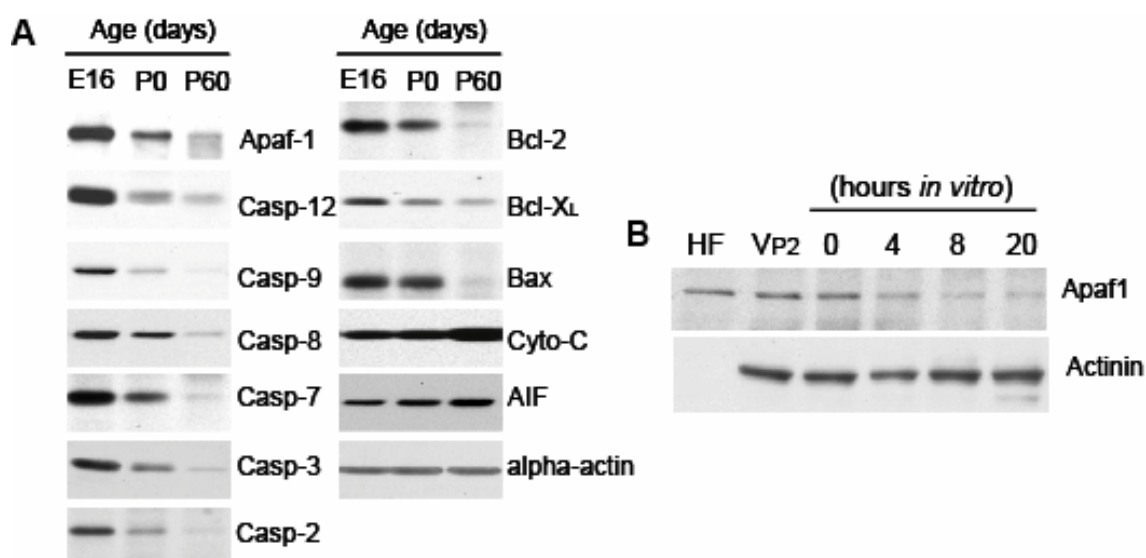


Objectiu 1. *Aprofundir en el coneixement dels mecanismes que confereixen resistència a la mort dependent de caspases al miocardi, mitjançant l'anàlisi de l'expressió de la maquinària de mort cel·lular dependent de caspases en els cardiomiòcits en condicions control i en condicions d'estrès.*



1. La regulació a la baixa de les vies de mort dependents de caspases durant el desenvolupament s'associa amb una disminució en l'activació de caspases induïda per isquèmia en els cardiomiòcits.

L'expressió de les principals proteïnes reguladores de la mort cel·lular dependent de caspases disminueix amb l'edat en el miocardi de rata (**Fig. 29A**). Caspases, proteïnes de la família de Bcl2 pro i antiapoptòtiques, i la proteïna adaptadora de la via intrínseca de mort Apaf-1 són silenciades durant el desenvolupament cardíac. La repressió dels gens apoptòtics es dona també en cardiomiòcits postnatsals *in vitro* (**Fig. 29B**).

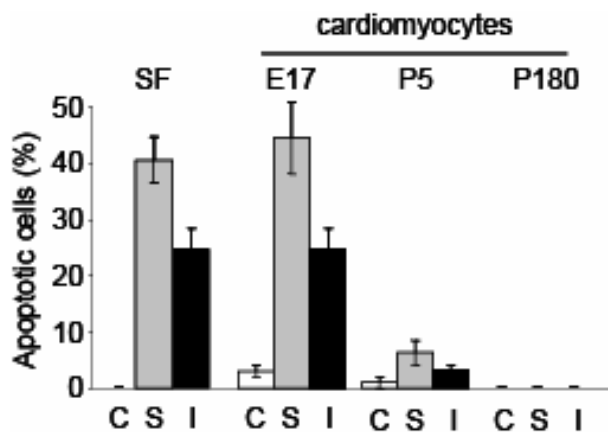


**Figura 29. Silenciament de l'expressió de caspases *in vivo* i *in vitro* durant la diferenciació dels cardiomiòcits.** A) L'expressió de caspases, citocrom c, proteïnes de la família de Bcl2 i Apaf-1 s'ha detectat en extractes en SDS de ventricles de cors de dia embrional 16 (E16), neonatals (P0) i de rates de 60 dies (P60). B) Expressió d'Apaf-1 en extractes proteics de fibroblasts cardíacs (HF), de ventricle de rata de 2 dies d'edat ( $V_{P2}$ ) i de cardiomiòcits de rates de 3 dies d'edat en cultiu entre 0 i 20h. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

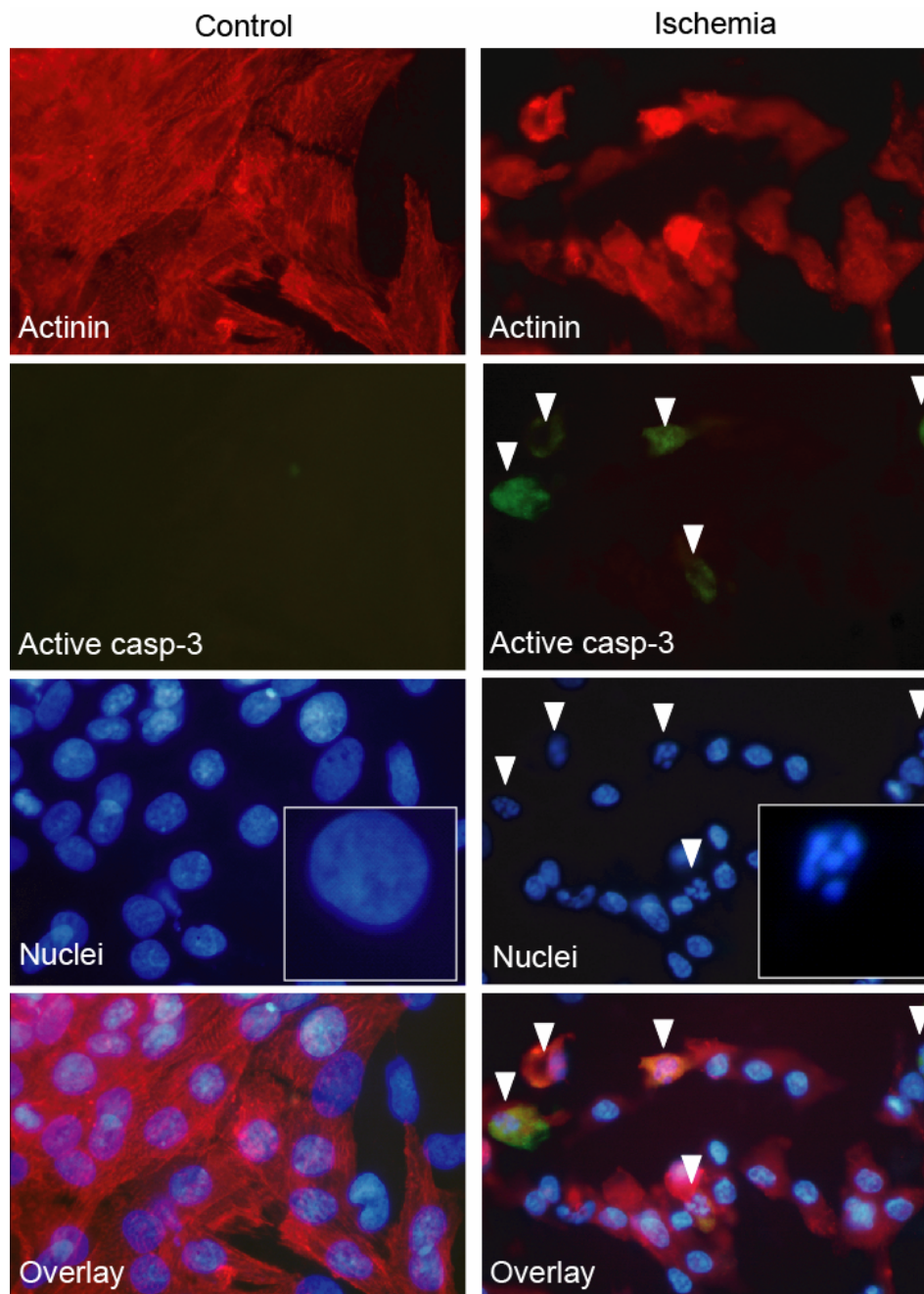
El nostre model de isquèmia experimental en cultius cel·lulars s'aconsegueix sotmetent les cèl·lules en cultiu a solució de Tirode dins d'una cambra hipòxica (descriu a Materials i Mètodes), i que s'acidifica durant la hipòxia (pH final 6,1 – 6,4). S'han utilitzat cultius primaris de fibroblasts de pell com a control positiu de l'activació de caspases (Mayorga et al., 2004). En tincions per immunocitoquímica hem observat activació de caspasa 3 executora en els cardiomiòcits embrionals i en

## Resultats

els fibroblasts de pell durant el tractament de 16h en isquèmia o 16h en estaurosporina 1  $\mu$ M, però en canvi no s'ha detectat activació de caspasa 3 ni en els cardiomiòcits neonatals ni en els adults durant els mateixos tipus de tractament (**Fig. 30, A, B, C i D**).

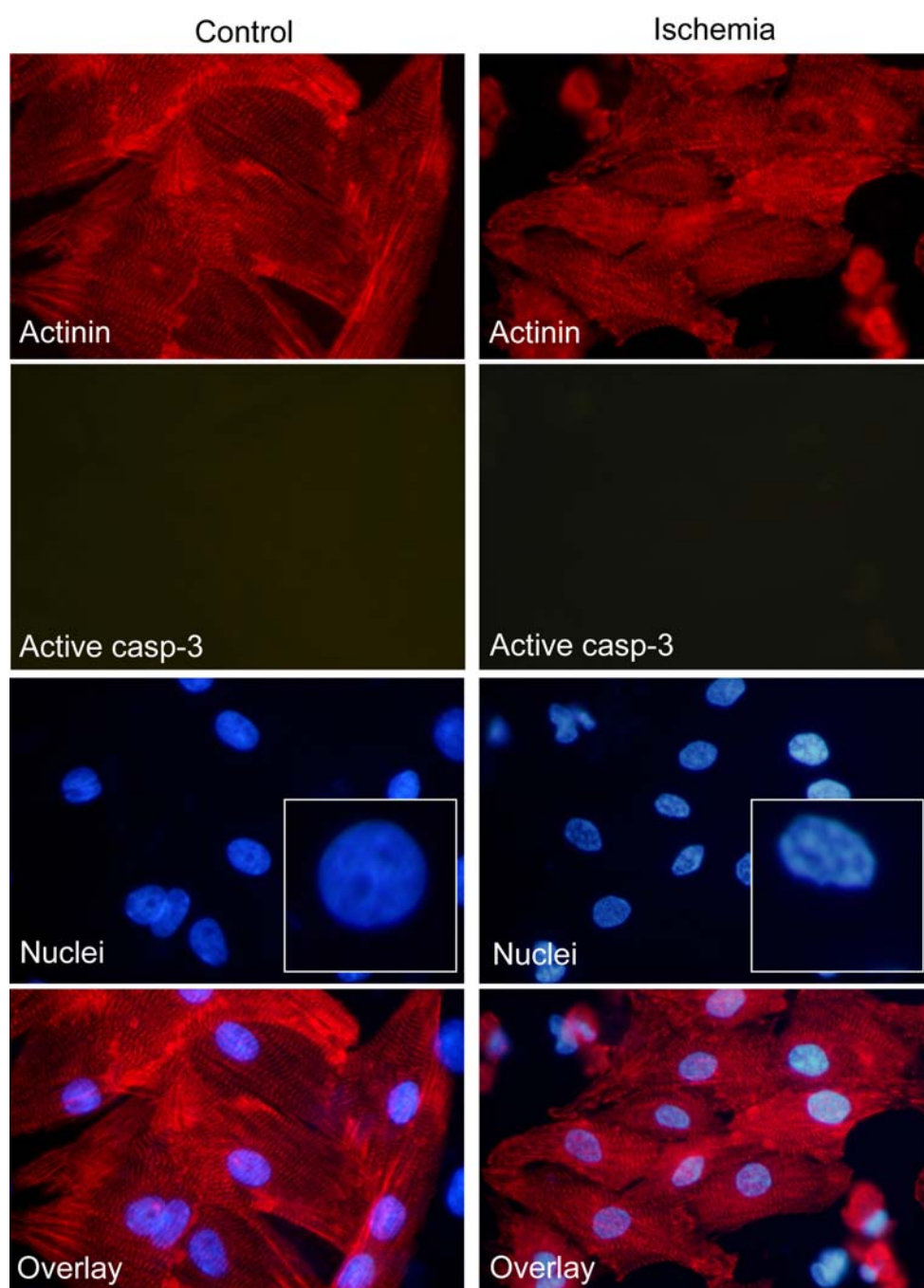


**Figura 30A.** Els cardiomiòcits, un cop finalitzada la vida embrional, no presenten caspasa 3 activa. Les cèl·lules que expressen caspasa 3 tallada i presenten el nucli fragmentat s'han comptat com a apoptòtiques en cultius de fibroblasts de pell i de cardiomiòcits embrionals, postnatsals i adults. C, control; S, estaurosporina 1  $\mu$ M 16h; I, 16h d'isquèmia. Els fibroblasts de pell (SF) s'utilitzen com a control positiu de mort apoptòtica dependent de caspases.

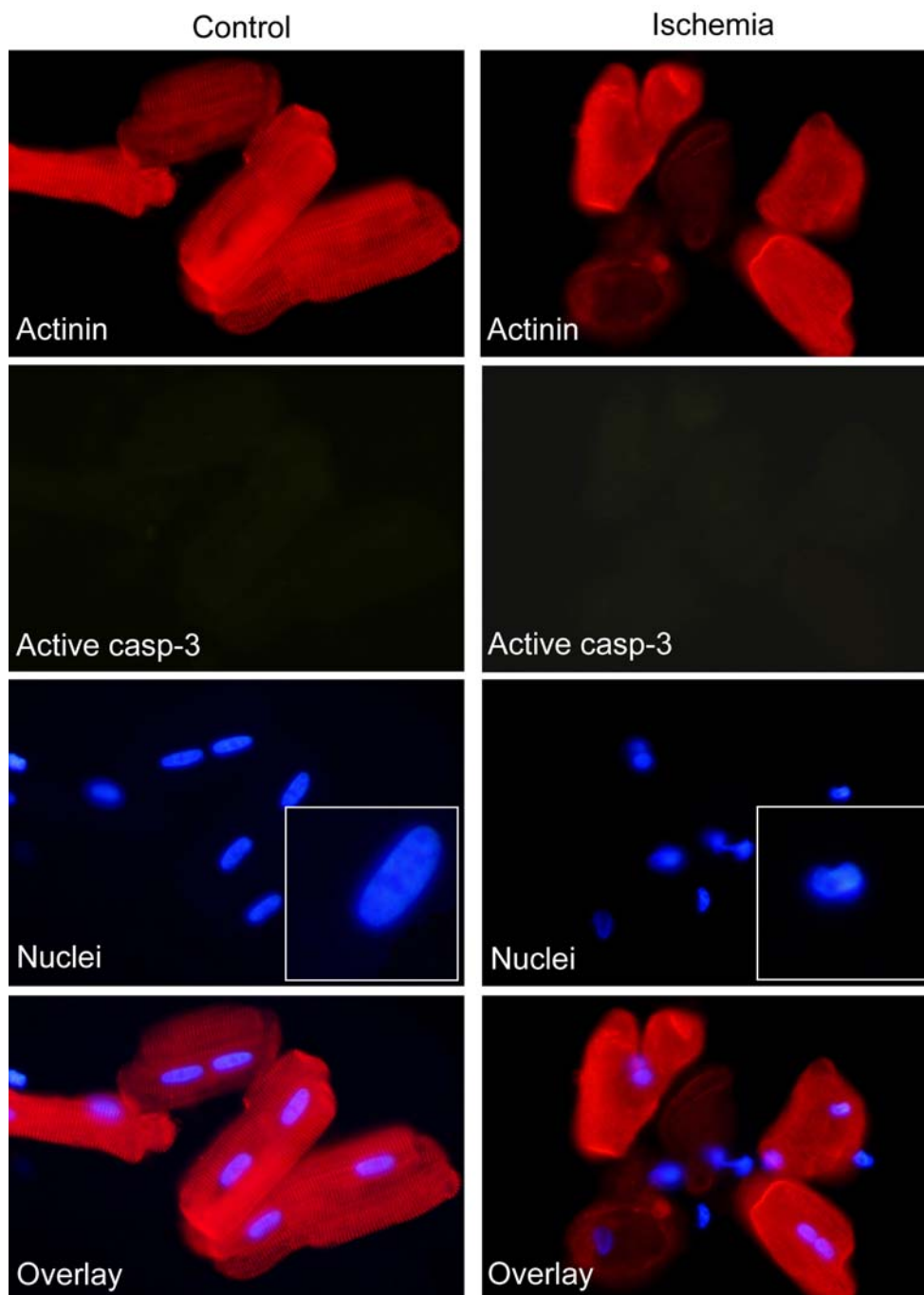


**Figura 30B. Detecció per immunofluorescència de caspasa 3 activa i fragmentació nuclear en cardiomiòcits embrionals.** El cultiu de cardiomiòcits embrionals s'ha realitzat a partir d'embrions de rata de dia embrional E17, plantats en plaques pretractades amb col·lagen. Al cap de 20h de cultiu es canvia el medi a medi isquèmic i es cultiven durant 16h en condicions de hipòxia (*ischemia*) o es deixen sense tractar (*control*). Les cèl·lules s'han fixat en una solució de PFA 4%, utilitzant anticossos per detectar la proteïna específica de cor actinina (vermell) i de caspasa 3 activa (verd). La cromatina s'ha teñit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). Les puntes de fletxa senyalen els cardiomiòcits que presenten mort cel·lular dependent de caspases. S'ha amplificat la imatge d'un nucli representatiu de control i isquèmia per apreciar la morfologia nuclear. Les imatges són representatives de tres experiments independents.





**Figura 30C. Detecció per immunofluorescència de caspasa 3 activa i fragmentació nuclear en cardiomiòcits postnatsals.** Cultiu de cardiomiòcits postnatsals a partir de cries de rata de 5 dies d'edat, sembrats en plaques pretractades amb gelatina. Al cap de 24h de cultiu es canvia el medi a medi isquèmic i es cultiven durant 16h en condicions de hipòxia (*ischemia*) o es deixen sense tractar (*control*). Es realitza la immunofluorescència de la proteïna específica de cor actinina (vermell) i de caspasa 3 activa (verd) en cèl·lules fixades en una solució de PFA al 4%. La cromatina s'ha tenyit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). S'ha amplificat la imatge d'un nucli representatiu de control i isquèmia per apreciar la morfologia nuclear. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

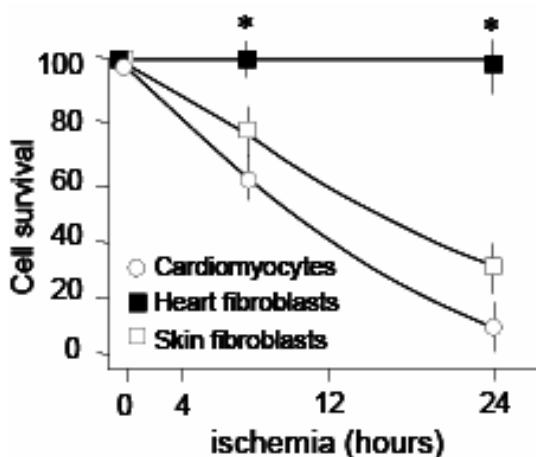


**Figura 30D. Detecció per immunofluorescència de caspasa 3 activa i fragmentació nuclear en cardiomiòcits adults.** Cultiu de cardiomiòcits adults a partir rates mascle de 6 mesos d'edat, sembrats en plaques pretractades amb laminina. Al cap de 24h de cultiu es posen en medi isquèmic i es cultiven durant 16h en condicions de hipòxia (*ischemia*) o es deixen sense tractar (*control*). Es realitza la immunofluorescència de la proteïna específica de cor actinina (vermell) i de caspasa 3 activa (verd) en cèl·lules fixades en una solució de PFA al 4%. La cromatina s'ha tenyit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). S'ha amplificat la imatge d'un nucli representatiu de control i isquèmia per apreciar la morfologia nuclear. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

## Resultats

A pesar que els cardiomiòcits no presenten activació de les vies de mort dependents de caspases després del naixement, hem observat que la isquèmia indueix aproximadament el mateix nivell de mort cel·lular en els cardiomiòcits postnatsals que en fibroblasts de pell, un tipus cel·lular on es produeix mort dependent de caspases, mentre que els fibroblasts cardíacs sobreviuen al mateix període de isquèmia (**Fig. 31**). En relació a aquest tema, en treballs anteriors del nostre grup hem demostrat que els fibroblasts cardíacs són resistent a la mort apoptòtica gràcies a l'elevada expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 (Mayorga et al., 2004).

El conjunt d'aquestes dades estableixen una correlació entre el silenciament dels gens apoptòtics durant el desenvolupament del miocardi i la pèrdua de l'habilitat d'activar mort cel·lular dependent de caspases en els cardiomiòcits postnatsals.

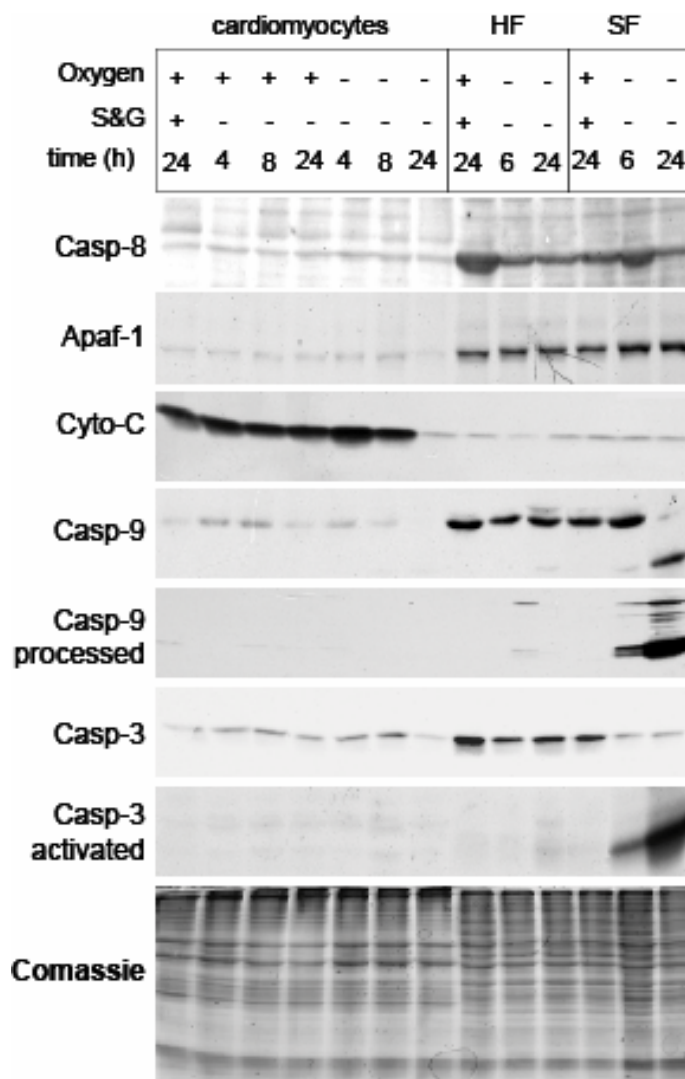


**Figura 31.** Recompte de viabilitat cel·lular en cardiomiòcits postnatsals, en fibroblasts cardíacs i de pell. Els valors representen el percentatge de cèl·lules viues *versus* cèl·lules totals a la placa comptades a temps 0. \*,  $p < 0,01$  *versus* cardiomiòcits i fibroblasts de pell. Les dades són la mitjana  $\pm$ S.E. de tres experiments independents realitzats per triplicat.

### 2. Manca de reexpressió de caspases i d'activitat caspasa en els cardiomiòcits durant la isquèmia, i rellevància de la via mitocondrial en la mort apoptòtica dels fibroblasts induïda per isquèmia.

L'expressió de les caspases iniciadores 8 i 9, de la proteïna reguladora postmitocondrial Apaf-1 i de la caspasa executora 3, es troba significativament més reduïda en els cardiomiòcits postnatsals en cultiu que en els fibroblasts cardíacs i de pell (**Fig. 32**). És important destacar que l'expressió cardíaca d'aquests gens no augmenta durant un curs temporal de isquèmia (**Fig. 32**), indicant que en condicions d'estrès no s'indueix la reexpressió de les proteïnes de reguladores de mort cel·lular reprimides durant el desenvolupament (**Fig. 29**). En els fibroblasts de pell hem

observat processament de caspasa 9, la caspasa iniciadora de la via mitocondrial, al cap de 6 hores de isquèmia i a temps més llargs també l'hem observat en els fibroblasts cardíacs, però no s'observa processament de caspasa 9 en els cardiomiòcits neonatals (**Fig. 32**).



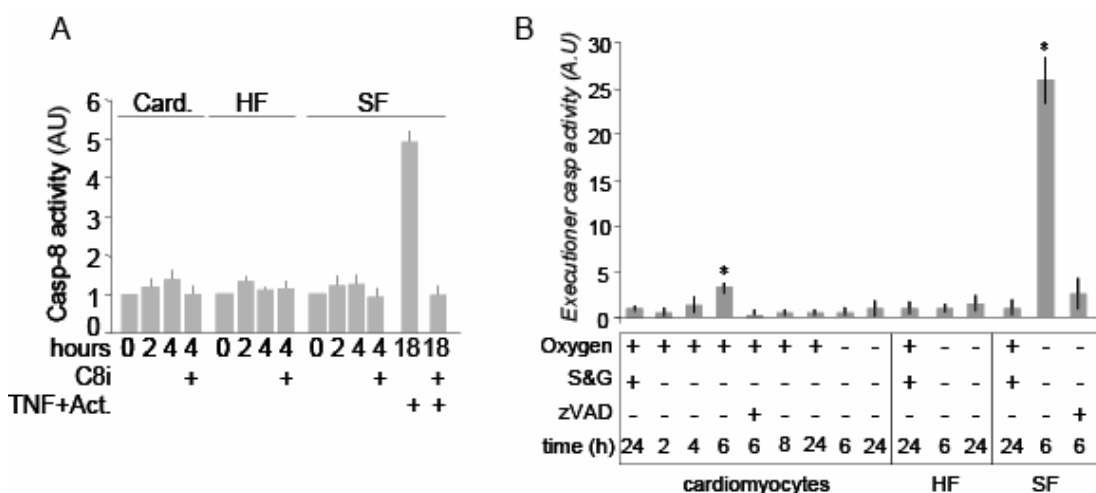
**Figura 32. Manca de reexpressió de caspases en cardiomiòcits en isquèmia.** Detecció de caspases, els seus productes tallats (actius) i d'alguns reguladors d'apoptosi per Western Bot en extractes totals de cardiomiòcits de dia postnatal 4, i fibroblasts cardíacs (HF) i de pell (SF) en cultiu en presència o absència de sèrum, glucosa (S&G) i oxigen. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

L'activitat de caspasa 8 es mesura com a un indicador del paper de la via dels receptors de mort durant la mort cel·lular en isquèmia, encara que l'activitat

## Resultats

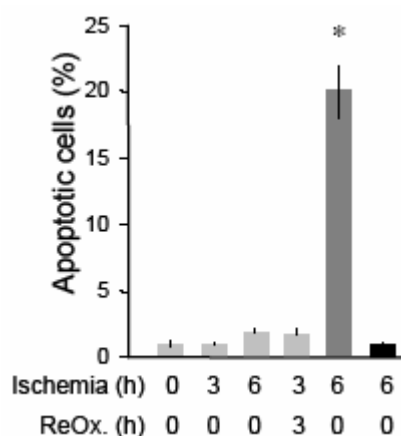
enzimàtica detectada en aquest assaig no es deu únicament a caspasa 8, sinó que altres caspases també poden tallar el substrat fluorogènic utilitzat, però en menor proporció, pel que s'anomena activitat caspasa 8-like. En els nostres resultats no s'ha detectat activitat de caspasa 8 ni en els cardiomiòcits en isquèmia, ni en els fibroblasts de pell i cardíacs en isquèmia (**Fig. 33A**), indicant que la via extrínseca de mort no està implicada en la mort dels cardiomiòcits i fibroblasts en la isquèmia cardíaca. El tractament de fibroblasts de pell amb TNF $\alpha$  i actinomicina D s'ha utilitzat com a control positiu de l'activació de caspasa 8.

En assaigs d'activitat enzimàtica de caspases executores (o caspasa 3-like) no hem detectat activitat de caspasa 3 en els cardiomiòcits en isquèmia, però en canvi els fibroblasts de pell sí que presenten clarament activitat de les caspases executores en condicions de isquèmia (**Fig. 33B**). Aquests resultats suggereixen que la baixa expressió de la maquinària dependent de caspases en les cardiomiòcits postnatsals es manté durant la isquèmia, limitant així l'impacte de l'activació de caspases.



**Figura 33.** A) Activitat de caspasa 8 iniciadora en extractes de cardiomiòcits (Card.), fibroblasts cardíacs (HF) i de pell (SF) cultivats en presència o absència d'un inhibidor de caspasa 8 (C8i), mesurada en unitats arbitràries (AU, Arbitrary Units). Els fibroblasts de pell tractats amb TNF $\alpha$  + actinomicina D s'han utilitzat com a control positiu. B) Activitat de les caspases executores mesurada en extractes de cardiomiòcits postnatsals, fibroblasts de pell (SF) i cardíacs (HF) en deprivació de sèrum i glucosa (S&G) o en deprivació de sèrum, glucosa i oxigen (*ischemia*) mesurada en unitats arbitràries (AU, Arbitrary Units). zVAD, inhibidor general de caspases z-VAD.fmk a 100  $\mu$ M; \*,  $p < 0,01$  versus control. Les dades són la mitjana  $\pm$ S.E. de tres assaigs independents realitzats per duplicat.

A més a més, el processament de les caspases executores no incrementa substancialment quan els cultius de cardiomiòcits adults en isquèmia (pH 6,1 – 6,4) són sotmesos a reoxigenació i medi estàndard (pH 7 – 7,5) (**Fig. 34**). No obstant, el tractament de isquèmia activa la via de mort mitocondrial en tipus cel·lulars proliferants, com ara els fibroblasts (**Fig. 32**) o els cardiomiòcits embrionals (**Fig. 34**).



**Figura 34.** Recompte de cèl·lules apoptòtiques en cultius de cardiomiòcits adults (barres gris clar), cardiomiòcits embrionals (barra gris fosc) i fibroblasts cardíacs (barra negra), en diversos punts temporals de isquèmia i reoxigenació. Es consideren cèl·lules apoptòtiques aquelles que expressen caspasa 3 activa per immunofluorescència i cromatina condensada. Les dades representen el nombre de cèl·lules apoptòtiques respecte el nombre total de cèl·lules en cada pou, i s'ha calculat la mitjana  $\pm$ S.E. de 4 pous per tractament. \*,  $p < 0,01$  *versus* cardiomiòcits adults.



Objectiu 2. *Esbrinar els mecanismes implicats en la mort induïda per isquèmia en els cardiomiòcits, mitjançant l'estudi sistemàtic de les vies apoptòtiques conegudes en un model cel·lular de isquèmia.*

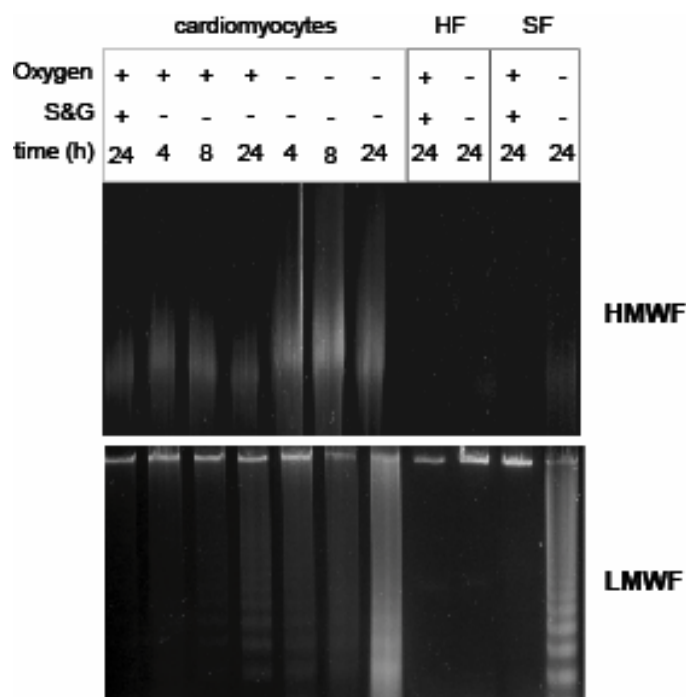
- a) *Estudi de les molècules proapoptòtiques conegudes independents de caspases alliberades del mitocondri en condicions d'estrès, AIF i EndoG.*





3. El patró de degradació d'ADN induït durant la isquèmia en els cardiomiòcits suggereix la participació de mecanismes independents de caspases.

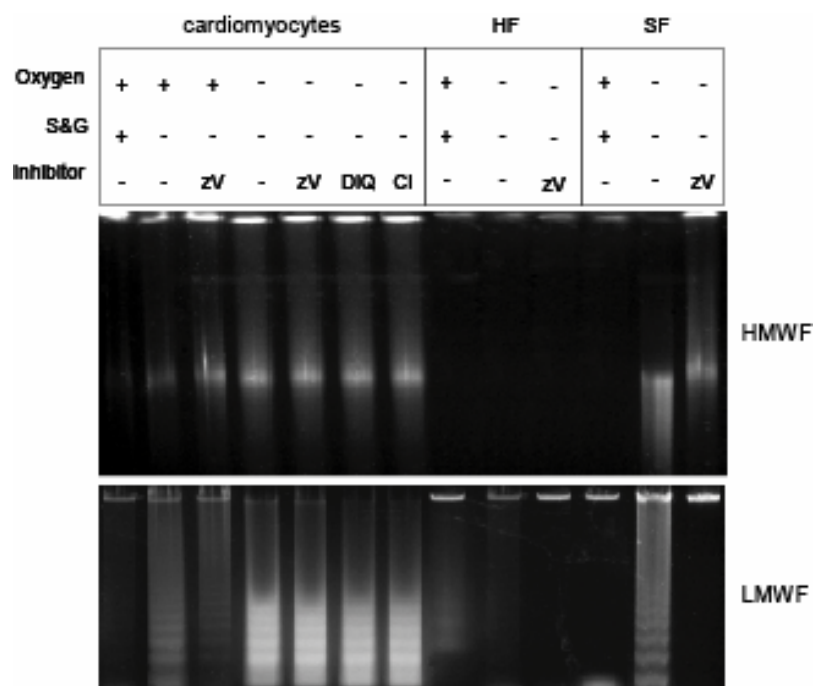
La mort cel·lular dependent de caspases indueix un patró característic de degradació d'ADN, relacionat a l'activitat d'endonucleases que tallen l'ADN entre els nucleosomes alliberant fragments d'ADN de baix pes molecular, aquest fenomen es refereix utilitzant l'anglicisme *ladder* (escala) d'ADN, en referència a què després de l'electroforesi d'aquests fragments s'observa un patró de bandes que recorda a una escala de mà. La mort cel·lular programada (MCP) independent de caspases pot induir fragmentació d'ADN d'alt pes molecular, principalment en fragments d'aproximadament 50kb (Susin et al., 1996), i/o fragmentació d'ADN de baix pes molecular, que en l'electroforesi s'observa un patró de bandes difoses amb un fons de degradació, patró que s'anomena *smear*, i que és degut a la capacitat de les nucleases independents de caspases, com ara endonucleasa G, de tallar entre els nucleosomes i també dins dels nucleosomes d'ADN (Widlak et al., 2001).



**Figura 35.** Anàlisi simultani de la fragmentació d'ADN de baix (LMWF) i alt (HMWF) pes molecular en cardiomiòcits, fibroblasts cardíacs (HF) i de pell (SF) en un curs temporal de isquèmia, en cultius exposats a la presència o absència d'oxigen i/o de glucosa i sèrum (S&G). Els resultats d'aquesta figura són representatius de tres experiments independents.

## Resultats

En condicions aeròbiques, la deprivació de glucosa i sèrum durant 20h en un cultiu de cardiomiòcits dóna dos tipus de degradació d'ADN. Una degradació dèbil de l'ADN que presenta un patró de *ladder* d'ADN (**Fig. 35**, panell inferior) que es pot prevenir parcialment amb l'ús de l'inhibidor general de caspases z-VAD.fmk (**Fig. 36**, panell inferior), i fragmentació de l'ADN d'alt pes molecular (**Fig. 35**, panell superior) que no es bloqueja per l'ús de l'inhibidor z-VAD.fmk (**Fig. 36**, panell superior).



**Figura 36. La isquèmia indueix fragmentació d'ADN independent de caspases en els cardiomiòcits postnatals.** Anàlisi simultani de la fragmentació d'ADN de baix (LMWF) i alt (HMWF) pes molecular en cardiomiòcits, fibroblasts cardíacs (HF) i de pell (SF) després de 18 hores d'exposició a deprivació de sèrum i glucosa (S&G) o a isquèmia en cardiomiòcits, fibroblasts cardíacs (HF) i de pell (SF), amb o sense 100  $\mu$ M de l'inhibidor general de caspases z-VAD.fmk (zV), 30  $\mu$ M de l'inhibidor de PARP-1 DIQ, o 100  $\mu$ M de l'inhibidor de calpaïnes MDL28170 (CI). Els resultats d'aquesta figura són representatius de tres experiments independents.

Durant la isquèmia, és a dir, durant el tractament amb deprivació de sèrum i glucosa en condicions de hipòxia i acidosi, l'ADN dels cardiomiòcits es fragmenta de tal manera que presenta un patró difós dels fragments de baix pes molecular quan és migrat en un gel d'agarosa. Aquest patró difós de l'ADN en isquèmia no es pot inhibir per l'ús de l'inhibidor de caspases z-VAD.fmk. La proteïna PARP-1 s'ha

implicat en la mort cel·lular neuronal induïda per isquèmia (Eliasson et al., 1997), no obstant això, l'utilització dels inhibidors de PARP, DIQ i DPQ, en cardiomiòcits en isquèmia no bloqueja el dany a l'ADN. A més, tot i que s'ha proposat la implicació de les calpaïnes en l'alliberament d'AIF *in vitro* (Polster et al., 2005), en el nostre model la utilització de l'inhibidor general de calpaïnes MDL 28170 no pot prevenir la degradació d'ADN d'alt pes molecular en cardiomiòcits en isquèmia (**Fig. 35 i 36**). La fragmentació d'ADN d'alt pes molecular observada en els cardiomiòcits, que és compatible amb l'activitat de les vies de mort independents de caspases, s'activa ràpidament al cap de poques hores de isquèmia (**Fig. 35**, panell superior), i no és inhibible per tractaments amb l'inhibidor de caspases z-VAD.fmk ni amb l'inhibidor de PARP-1 DIQ.

D'altra banda, en els fibroblasts cardíacs no s'ha observat degradació d'ADN en isquèmia després de 24h de tractament, en concordança amb resultats previs del nostre grup (Mayorga et al., 2004), i en l'assaig de viabilitat cel·lular hem demostrat que els fibroblasts cardíacs sobreviuen a 24h de isquèmia (**Fig. 31**). En canvi, els fibroblasts de pell en isquèmia presenten un patró canònic de degradació d'ADN de baix pes molecular (*ladder*), (**Fig. 35 i 36**).

Fins a la publicació dels resultats mostrats en aquesta tesi, cap treball havia publicat estudis de fragmentació de l'ADN d'alt pes molecular en cardiomiòcits primaris en cultiu, els estudis sobre MCP al cor fins aleshores només mostraven fragmentació de l'ADN de baix pes molecular. El nostre treball revela que la fragmentació de l'ADN d'alt pes molecular apareix després de 4 hores de isquèmia, mentre que no es dona una degradació de l'ADN de baix pes molecular clara fins a les 24 hores (**Fig. 35**).

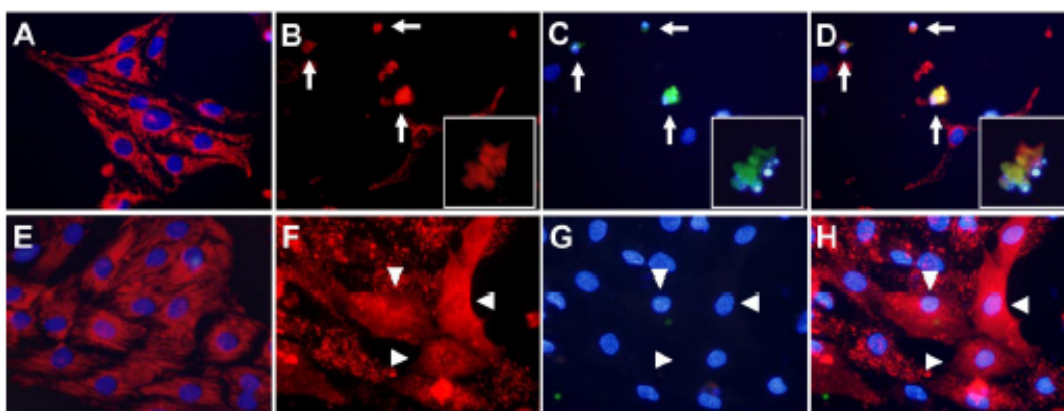
Per tant, el patró de degradació d'ADN durant la isquèmia en els cardiomiòcits i la seva execució tot i la presència d'inhibidors de caspases, suggereixen un mecanisme de mort cel·lular independent de caspases.

## Resultats

### 4. La isquèmia indueix l'alliberament de citocrom c, AIF truncat i endonucleasa G dels mitocondris en absència d'activació de caspases.

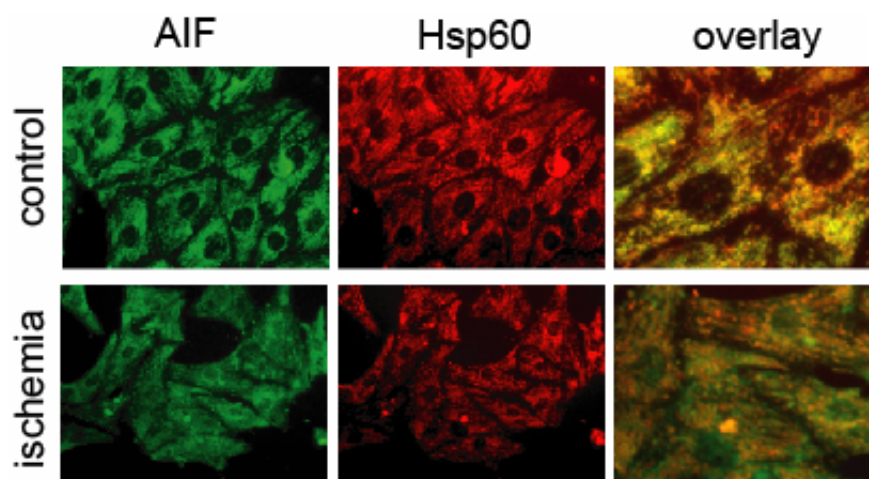
Resultats previs del grup han demostrat que el tractament amb estaurosporina no indueix activació de caspases en cardiomiòcits tot i que s'observa translocació de citocrom c, i que la sobreexpressió d'Apaf-1 antagonitza parcialment aquesta resistència (Sanchis et al., 2003). Per estudiar els mecanismes de mort cel·lular dels cardiomiòcits durant la isquèmia hem analitzat l'alliberament de factors mitocondrials proapoptòtics durant la isquèmia en cardiomiòcits en cultiu.

Durant la isquèmia s'ha detectat translocació de citocrom c en cardiomiòcits embrionals i postnatsals (**Fig. 37**, panells B, D, F i H, i **Fig. 39**); no obstant això, aquest esdeveniment va seguit de tall de caspasa 3 (activació) i fragmentació nuclear en els cardiomiòcits embrionals (**Fig. 30 i 37**, panells C i D) però no en els cardiomiòcits postnatsals (**Fig. 37**, panells G i H). Així doncs hem observat que l'alliberament de citocrom c en els cardiomiòcits postnatsals no va seguit d'activació de caspases.



**Figura 37. La isquèmia dispara la translocació de citocrom c en els cardiomiòcits.** Tinció per immunofluorescència de citocrom c (vermell) i caspasa 3 tallada (verd) en cultius primaris de cardiomiòcits embrionals (panells A-D) o cardiomiòcits postnatsals (panells E-H), en condicions control (panells A i E) o tractament de 6h de isquèmia (resta de panells). La cromatina es mostra en blau. Els panells B i F corresponen a citocrom c; els panells C i G mostren l'expressió de caspasa 3 tallada i la cromatina nuclear; els panells D i H mostren la superposició dels panells anteriors. Les fletxes senyalen les cèl·lules on s'està produint alliberament de citocrom c, activació de caspasa 3 i fragmentació nuclear, i les puntes de fletxa senyalen les cèl·lules on es dona translocació de citocrom c sense activació de caspases. S'ha amplificat una cèl·lula embrional representativa en apoptosi.

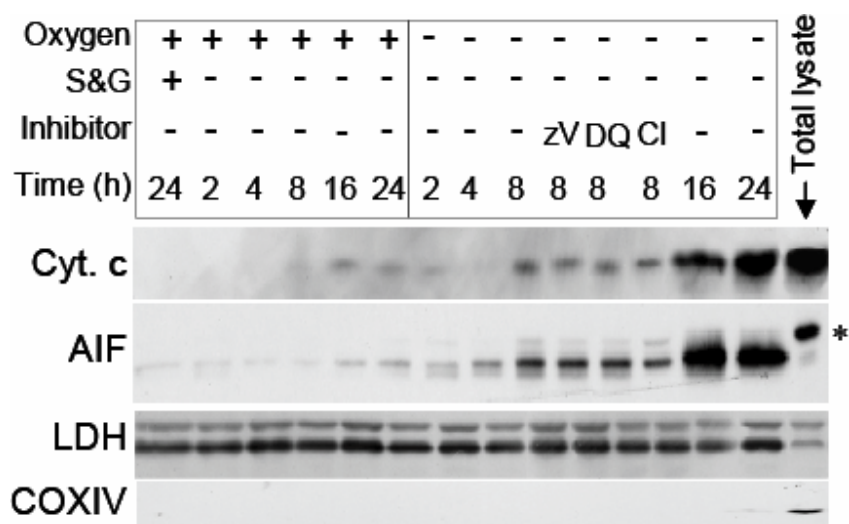
Les proteïnes mitocondrials AIF i EndoG han estat proposades com a proteïnes executores de la MCP, un cop translocades al citosol (Susin et al., 1996; Li et al., 2001). Hem observat que AIF surt del mitocondri durant la isquèmia cardíaca tant per immunocitoquímica (**Fig. 38**) com per Western Bot (**Fig. 39**).



**Figura 38.** La isquèmia dispara la translocació d'AIF truncat en els cardiomiòcits. Immunofluorescència d'AIF (verd) i de marcador mitocondrial Hsp60 (vermell) en cardiomiòcits control (*control*) o després de 18h de tractament en deprivació de sèrum, glucosa i oxigen (*ischemia*). Superposició d'AIF i Hsp60 (*overlay*), on el color taronja significa localització mitocondrial i el color verd translocació d'AIF al citosol.

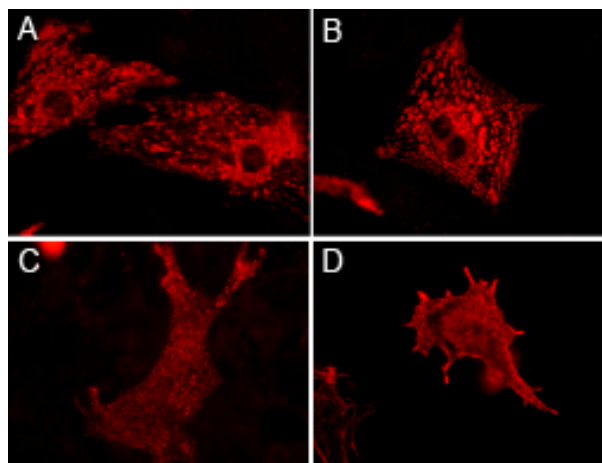
La forma citosòlica d'AIF que s'observa per Western Blot és més petita que la forma mitocondrial, tal com ho detecta l'anticòs utilitzat (Taula 2, Materials i Mètodes) dirigit a la regió C-terminal de la proteïna (**Fig. 39**). Aquest resultat concorda amb el tall proteolític d'AIF, en posició N-terminal, induït per isquèmia que s'ha proposat recentment, tall que permet a AIF desunir-se de la membrana mitocondrial interna i la seva translocació subsegüent (Otera et al., 2005). S'ha proposat que aquest tall pot dependre, *in vitro*, de l'activitat calpaïna o catepsina (Otera et al., 2005; Polster et al., 2005). No obstant, el pretractament dels cardiomiòcits en cultiu amb l'inhibidor general de calpaïnes MDL 28170 no pot evitar el tall d'AIF ni el seu alliberament durant la isquèmia (**Fig. 39**).

## Resultats



**Figura 39.** La isquèmia dispara la translocació d'AIF truncat en els cardiomiòcits, de forma independent de l'activació de caspases. Immunodetecció de citocrom c i AIF en extractes citosòlics de cardiomiòcits en deprivació de sèrum i glucosa (S&G) i en isquèmia. zV, 100  $\mu$ M inhibidor general de caspases z-VAD.fmk; DQ, 30  $\mu$ M inhibidor de PARP-1; CI, 100  $\mu$ M inhibidor de calpaïnes MDL28170. La proteïna citosòlica lactat deshidrogenasa (LDH) s'ha utilitzat com a control de càrrega, i la subunitat IV de l'oxidasa de citocrom c (COXIV) s'ha detectat com a marcador de contaminació mitocondrial. \*, AIF mitocondrial, no tallat. Cada imatge en aquesta figura és representativa de tres experiments independents.

La translocació d'EndoG induïda per isquèmia s'ha estudiat per immunofluorescència i per Western Bot utilitzant tres anticossos comercials (Taula 2, Materials i Mètodes). No obstant, els nostres resultats suggereixen que aquestes anticossos no són específics en mostres de rata. Per tant, es va construir un plàsmid per a la sobreexpressió d'EndoG de ratolí unit a una cua polipeptídica FLAG al extrem C-terminal. El seguiment de EndoG-FLAG va demostrar que EndoG presenta un patró puntuat que exclou els nuclis en condicions basals, que concorda amb una localització mitocondrial (**Fig. 40**, panells A i B). No obstant, el patró de EndoG canvia durant la isquèmia, en concordança amb la seva translocació al citosol i al nucli (**Fig. 40**, panells C i D).

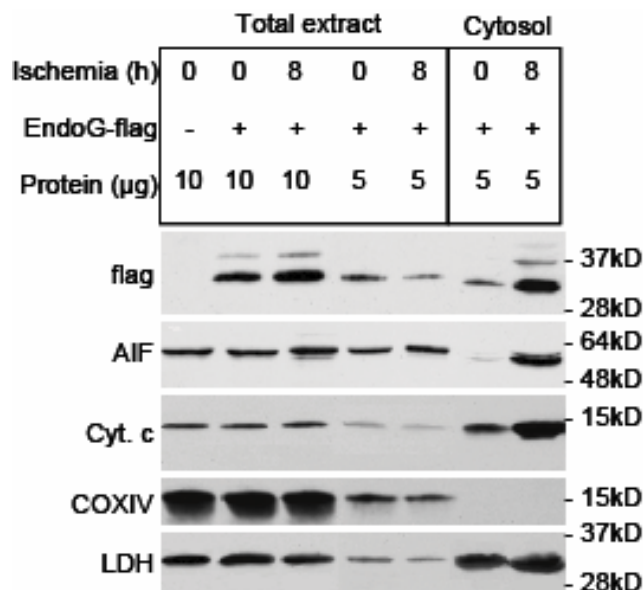


**Figura 40. La isquèmia indueix l'alliberament d'EndoG dels mitocondris cardíacs.** La transfecció dels cardiomiòcits amb la construcció EndoG-FLAG s'ha realitzat tal com s'ha descrit a Materials i Mètodes. Anàlisi de l'expressió d'EndoG-FLAG exogen per immunofluorescència utilitzant un anticòs anti-FLAG en cardiomiòcits control en cultiu al cap de 3 dies de transfecció (Panells A i B), i en cardiomiòcits exposats a 16h de isquèmia al tercer dia de transfecció (Panells C i D). Les imatges són representatives de tres experiments independents.

Hem verificat per Western Blot que la proteïna EndoG sobreexpressada presenta la talla esperada d'aproximadament 30kDa, i que no s'observen altres bandes que indiquin un possible tall de la molècula en els extractes de cardiomiòcits en isquèmia (**Fig. 41**), suggerint que la translocació de EndoG no depèn d'un tall proteolític, al contrari que el que s'observa per la molècula AIF (**Fig. 41**). El conjunt d'aquests resultats demostra que les proteïnes mitocondrials citocrom c, AIF truncat i endonucleasa G es transloquen al citosol durant la isquèmia en cardiomiòcits postnatsals de rata, tot i que caspases i calpaïnes no són essencials per al seu alliberament.



## Resultats

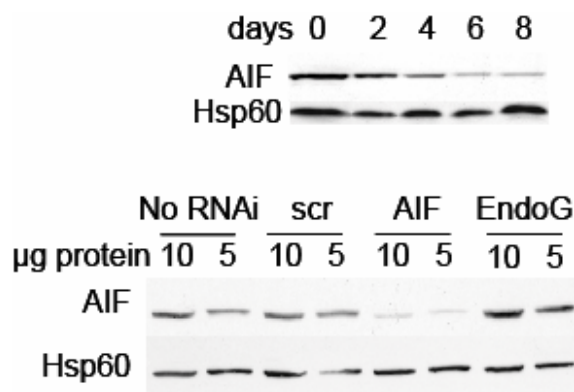


**Figura 41. La isquèmia induïx l'alliberament d'EndoG dels mitocondris cardíacs.** La transfecció dels cardiomiòcits amb la construcció EndoG-FLAG s'ha realitzat tal com s'ha descrit a Materials i Mètodes. Detecció d'EndoG-FLAG per electroforesi en SDS-PAGE en extractes de proteïna totals i en extractes de proteïna citosòlica en cardiomiòcits control i en isquèmia. La detecció d'AIF i citocrom c s'ha utilitzat per comprovar que el tractament de isquèmia induïx l'alliberament de proteïnes endògenes mitocondrials. COXIV s'utilitza com a marcador mitocondrial i LDH com a marcador de l'enriquiment en proteïnes citosòliques. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

### *5. EndoG és un executor important del processament de l'ADN en els cardiomiòcits durant la isquèmia.*

El patró de tall de l'ADN en els cardiomiòcits postnatsals en isquèmia indica la participació de mecanismes de mort independents de caspases. S'ha suggerit que AIF i EndoG executen la degradació de l'ADN en absència d'activació de caspases (Susin et al., 1996; Li et al., 2001). Això ens va encoratjar a verificar si AIF i EndoG, que són alliberats del mitocondri en condicions de isquèmia, participen en la fragmentació d'ADN observada durant la mort cel·lular cardíaca en aquest model. Es transdueixen els cardiomiòcits amb vectors lentivirals que porten construccions per shRNAi (small hairpin-based RNA interference) de cada proteïna. Al cap de 6 dies de la transducció, es tracten els cardiomiòcits en isquèmia (veure Materials i Mètodes). L'eficàcia del vector shRNAi d'AIF s'ha verificat mitjançant l'anàlisi de l'expressió dels nivells de proteïna AIF detectada en extractes totals de cardiomiòcits, que disminueix en els cultius transduïts amb l'RNAi d'AIF (**Fig. 42**).

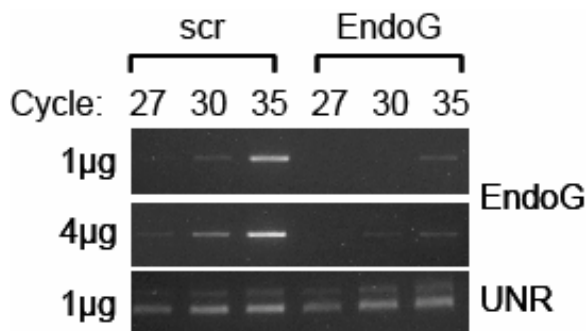
L'anàlisi del curs temporal d'expressió d'AIF als cardiomiòcits transduïts amb el plàsmid específic per al shRNAi d'AIF ha mostrat que la màxima reducció en l'expressió d'AIF s'aconsegueix al cap de sis dies de la infecció (**Fig. 42**, panell superior). Per tant, tots els experiments s'han iniciat el dia 6 de la transducció. L'expressió d'AIF s'ha reduït en un 80% en els cardiomiòcits transfectats (**Fig. 42**, panell inferior).



**Figura 42.** Curs temporal de l'expressió d'AIF en extractes de proteïna total de cardiomiòcits transduïts amb la construcció específica per shRNAi d'AIF (panell superior) analitzat per electroforesi de proteïnes en SDS. Expressió d'AIF en extractes proteïcs totals de cardiomiòcits control (no RNAi), transduïts amb la construcció *scrambled* (scr), deficients en AIF (AIF) i deficients en EndoG (EndoG) al cap de 6 dies de transducció, carregant 5 i 10 µg de cada (Panell inferior). Hsp60 s'ha utilitzat com a control de càrrega. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

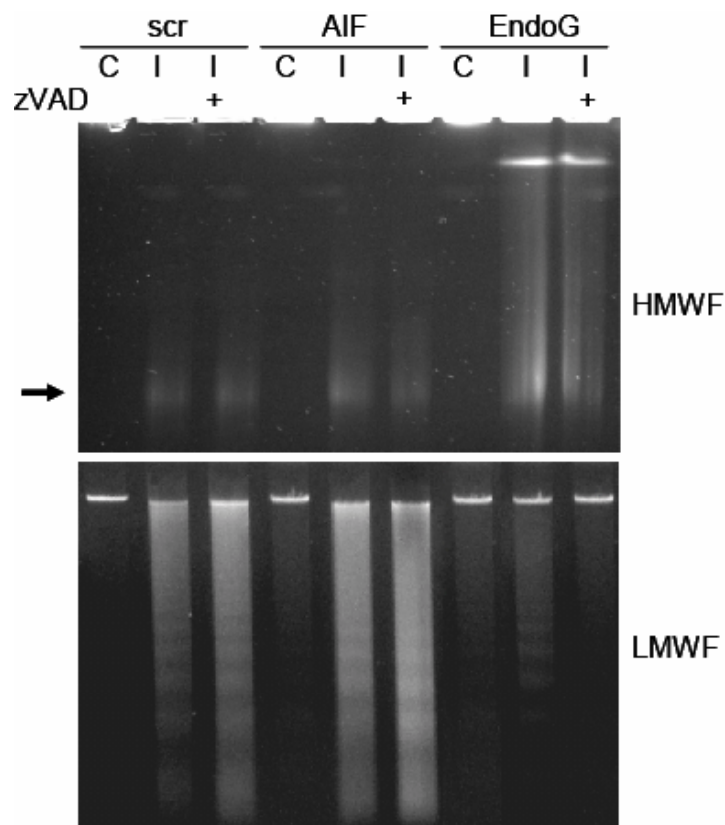
Per comprovar la reducció en l'expressió d'EndoG en les cèl·lules transduïdes utilitzant la construcció shRNAi d'EndoG s'ha utilitzat el mètode de transcripció reversa acoblada a PCR (RT-PCR) en extractes totals d'ARN (**Fig. 43**). Degut a que la reacció de PCR amplifica molt el senyal i pot saturar-se, s'han analitzat varis cicles d'una mateixa reacció, amb la qual cosa aconseguim discernir molt millor si les diferències observades entre els tractaments són significatives o no.

## Resultats



**Figura 43.** Nivells del producte de transcripció d'EndoG en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o cardiomiòcits deficientes en EndoG (EndoG). Reacció de RT-PCR realitzada a partir de 1 i 4 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 27, 30 i 35 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb SYBR® Safe. Com a control de càrrega s'ha realitzat la reacció de PCR a partir de 1 µg d'ARN en paral·lel per a la detecció del transcrit de *unr*. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

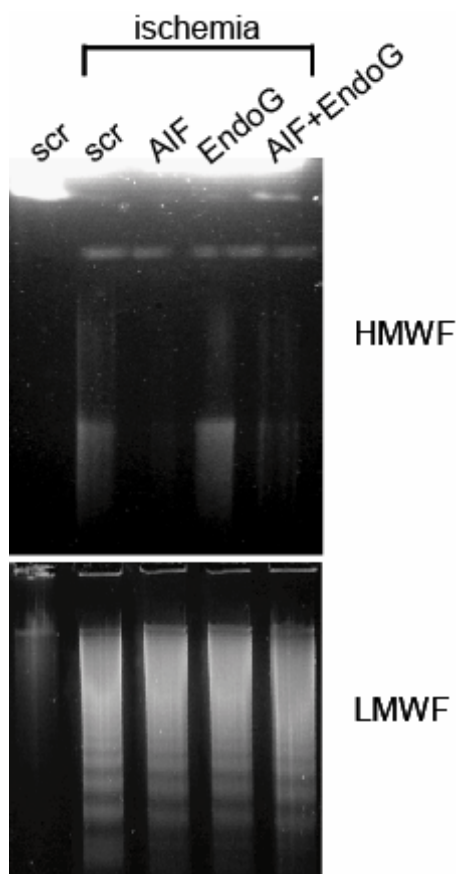
La reducció en l'expressió d'EndoG en cardiomiòcits neonatals en cultiu, però no la reducció en els nivells d'AIF, correlaciona amb una reducció important en el dany a l'ADN durant la isquèmia (**Fig. 44**). Els cardiomiòcits en isquèmia amb expressió d'EndoG reduïda mostra un patró de *ladder* dèbil, que es pot inhibir utilitzant l'inhibidor de caspases z-VAD-fmk, suggerint una contribució molt baixa de les caspases (**Fig. 44**). Cal remarcar que la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular induïda durant la isquèmia no es troba bloquejada en cèl·lules amb nivells reduïts d'expressió d'EndoG, suggerint la presència d'una altra nucleasa no identificada, independent d'AIF i d'EndoG, o d'un altre procés no vinculat a cap nucleasa en concret, i que treballa en absència d'activació de caspases.



**Figura 44. La disminució en l'expressió d'endonucleasa G protegeix als cardiomiòcits diferenciats de la fragmentació d'ADN induïda durant la isquèmia.** Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi d'EndoG (EndoG) i RNAi d'AIF (AIF) exposats a 18h de isquèmia i en presència (+) o absència de 100  $\mu$ M de z-VAD-fmk (zV). La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

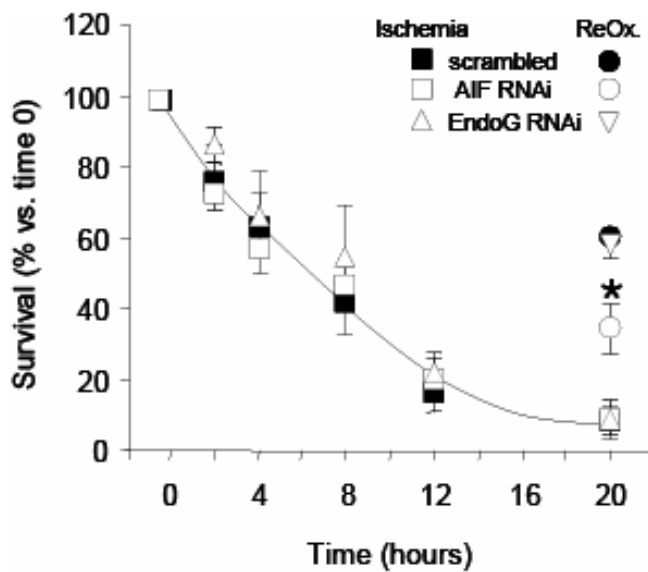
El fet que la proteïna AIF no sigui responsable de la degradació de l'ADN en els cardiomiòcits isquèmics contrasta amb la troballa que AIF resulta essencial per al processament de l'ADN d'alt pes molecular en fibroblasts de pell (**Fig. 45**), mentre que el processament d'ADN de baix pes molecular no és degut a l'activitat endonucleasa d'EndoG, sinó a l'activitat nucleasa dependent de caspases (**Fig. 36 i 45**).

## Resultats



**Figura 45.** Fragmentació d'ADN d'alt pes molecular (HMWF) i baix pes molecular (LMWF) induït per exposició a 18h de isquèmia en fibroblasts de pell transduïts amb la construcció *scrambled* (Scr), deficients per AIF (AIF), deficients per EndoG (EndoG) o deficients per ambdós (AIF+EndoG). Les imatges són representatives de tres experiments independents.

Per esbrinar si la reducció de l'expressió d'EndoG afavoria la supervivència dels cardiomiòcits en isquèmia, s'han realitzat anàlisis de supervivència cel·lular en cardiomiòcits deficients en EndoG, en AIF i transduïts amb la construcció *scrambled* (control). Ni la reducció en l'expressió d'AIF ni la d'EndoG poden evitar la mort cel·lular cardíaca induïda per isquèmia, tot i que la reducció en l'expressió d'AIF bloqueja substancialment la recuperació cel·lular cardíaca durant la reoxigenació (**Fig. 46**). Conjuntament, aquests resultats revelen un paper principal dels mecanismes de mort cel·lular independents de caspases en els cardiomiòcits en isquèmia, i identifiquen la proteïna EndoG com a un executor essencial del processament de l'ADN induït per isquèmia en aquestes cèl·lules.



**Figura 46. L'activitat d'EndoG no afecta la viabilitat dels cardiomiòcits durant la isquèmia i AIF limita la mort cel·lular durant la reoxigenació.** Curs temporal de viabilitat dels cardiomiòcits en cultiu entre 0h i 20 h de tractament de isquèmia (Ischemia). També s'ha realitzat el recompte de viabilitat després de 2h de isquèmia seguides de 18h de reoxigenació en medi estàndard (ReOx.). Les dades són la mitjana  $\pm$  S.E. de tres experiments independents realitzats en duplicat. \*,  $p < 0,05$  deficient en AIF *versus* scrambled i deficient en EndoG al mateix punt temporal.



Objectiu 2. *Esbrinar els mecanismes implicats en la mort induïda per isquèmia en els cardiomiòcits, mitjançant l'estudi sistemàtic de les vies apoptòtiques conegudes en un model cel·lular de isquèmia.*

*b) Anàlisi d'altres nucleases candidates que han estat relacionades amb l'activitat d'EndoG en la bibliografia: Fen-1, DNAses de tipus I i II, Topoisomerasa de tipus II, TatD i Exosc5.*





En aquest apartat ens hem proposat d'esbrinar l'acció d'altres nucleases durant la mort dels cardiomiòcits en isquèmia que complementin l'acció d'EndoG i expliquin la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular que no es pot explicar per l'acció d'EndoG. Aquestes nucleases les hem escollit com a possibles candidates per diversos motius, relacionats amb la bibliografia existent, que es detallen a la introducció de cada una d'elles.

Tot i que en apartats anteriors hem demostrat que el silenciament d'EndoG evita gairebé la totalitat de la fragmentació d'ADN de baix pes molecular durant la isquèmia cardíaca, el processament de l'ADN en fragments d'alt pes molecular en absència d'EndoG ens va fer pensar que existia alguna altra activitat nucleasa implicada en la degradació d'ADN als cardiomiòcits durant la isquèmia. Per aquest motiu vam iniciar l'estudi de diverses nucleases, que consideràvem possibles candidates a modular la degradació d'ADN segons la bibliografia existent.

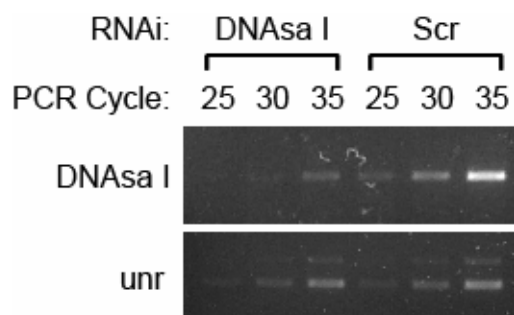
*6. La repressió en l'expressió de DNAsa I en els cardiomiòcits no afecta al patró de degradació isquèmic, així com la disminució conjunta en l'expressió d'AIF i EndoG en els cardiomiòcits no presenta efectes additius en el patró de degradació d'ADN en isquèmia.*

En el nemàtode *C. elegans* es coneixen diverses nucleases responsables de la degradació apoptòtica de l'ADN (Parrish and Xue, 2006) que, juntament amb la proteïna CPS-6 (Parrish et al., 2001) homòloga de la proteïna EndoG dels mamífers, considerem que podrien ser potencials responsables de la fragmentació d'ADN durant l'apoptosi en els cardiomiòcits en isquèmia. Per tal d'identificar la/les nucleasa/es responsable/s de la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular en els cardiomiòcits, hem disminuït l'expressió de les diverses nucleases candidates, que anirem detallant a continuació, gràcies a la transducció dels cardiomiòcits amb construccions plasmídiques per a shRNAi de les nucleases estudiades.

L'ADN nucleasa de tipus I (DNAsa I) dels mamífers és una nucleasa secretada present en sèrum, orina i algunes secrecions que s'ha implicat en la digestió de l'ADN extracel·lular o cromatina en zones de l'organisme amb elevat recanvi cel·lular o mort apoptòtica (Napirei et al., 2000). Estudis del mecanisme molecular de la fragmentació d'ADN apoptòtica en línies cel·lulars han revelat la

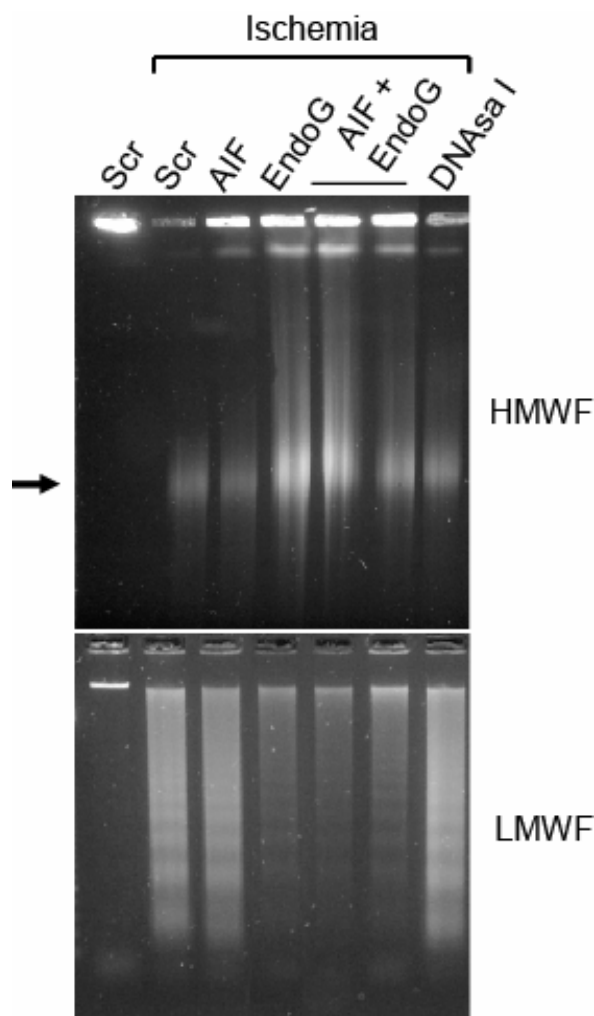
## Resultats

possible cooperació entre EndoG i DNAsa I, i han suggerit que DNAsa I produeix talls a l'ADN que faciliten l'acció d'EndoG (Oliveri et al., 2001; Widlak et al., 2001). Hem construït un plàsmid lentiviral per a disminuir la transcripció de la DNAsa I en els cardiomiòcits, l'eficàcia del qual hem verificat per rtPCR (**Fig. 47**).



**Figura 47.** Nivells del producte de transcripció de l'ADN nucleasa I (DNAsa I) en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o amb la construcció shRNAi per disminuir la transcripció de DNAsa I (DNAsa I). Reacció de RT-PCR a partir de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25, 27 i 30 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb SYBR® Safe. La detecció en paral·lel del transcrit de *untr* s'ha utilitzat com a control de càrrega. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

L'estudi de la integritat de l'ADN durant a repressió de DNAsa I en cardiomiòcits en cultiu en condicions de isquèmia (**Fig. 48**) ens mostra que DNAsa I aparentment no és essencial en el procés de degradació d'ADN durant la mort dels cardiomiòcits de rata. A pesar que en apartats anteriors ja hem verificat que AIF no afecta a la degradació d'ADN i que EndoG controla la fragmentació d'ADN de baix pes molecular, es va voler verificar si la repressió d'ambdós en una mateixa cèl·lula potenciava l'efecte de la repressió d'EndoG (**Fig. 48**), i el resultat observat és que la repressió conjunta d'AIF i EndoG no modifica el patró de degradació de l'ADN durant la isquèmia. Per la qual cosa podem pensar que no es troben en una mateixa via.



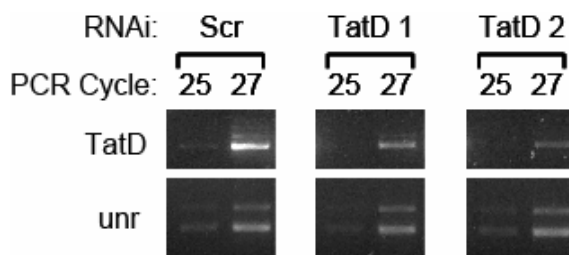
**Figura 48.** Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi d'EndoG (EndoG), RNAi d'AIF (AIF), RNAi d'EndoG i d'AIF alhora (AIF + EndoG) i RNAi de DNAsa I (DNAsa I) exposats a 16h de isquèmia. La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

7. Assaig d'integritat de l'ADN en cardiomiòcits en cultiu amb disminució de l'expressió de: *TatD*, *DNAsa I i II*, *Topoisomerasa II*, *Fen-1* i *Exosc5*.

En *E. coli* s'ha observat que TatD és una proteïna citoplasmàtica amb activitat DNAsa (Wexler et al., 2000). Estudis posteriors han trobat que TatD té un paper en la degradació apoptòtica d'ADN en *C. elegans* (Parrish and Xue, 2003) i en llevats (Qiu et al., 2005). En *C. elegans* l'utilització de l'RNAi contra CRN-2 (TatD) augmenta el fenotip de TUNEL observat en el mutant per CPS-6, suggerint que TatD podria funcionar en una via de degradació d'ADN diferent que la de EndoG

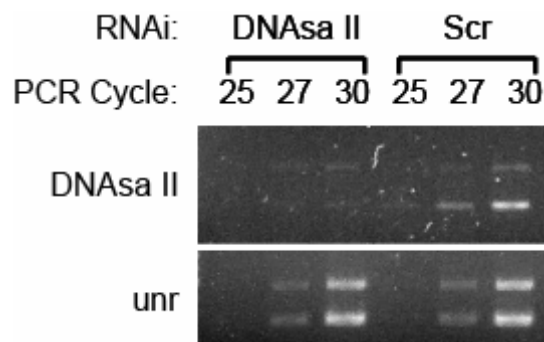
## Resultats

(Parrish and Xue, 2003). Els estudis en *S. Cerevisiae* deficients en TatD han observat un fenotip similar al dels nemàtodes deficients en CRN-2, i a més que la sobreexpressió de TatD en llevats facilita la mort (Qiu et al., 2005), suggerint que realment TatD actua com a una nucleasa apoptòtica. Així doncs hem dut a terme dues construccions lentivirals per a reprimir l'expressió de TatD en els cardiomiòcits, de les quals hem verificat l'eficàcia per rtPCR (**Fig. 49**).



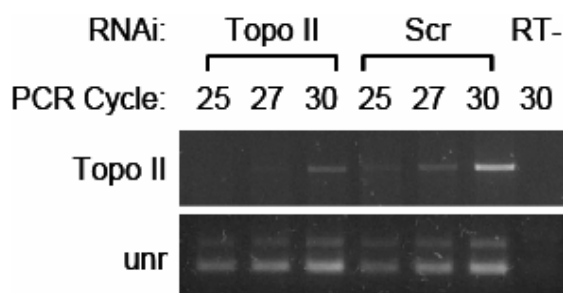
**Figura 49.** Nivells del producte de transcripció de TatD en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o amb les dues construccions per a la reducció de la transcripció de TatD: TatD RNAi 1 (TatD 1) i TatD RNAi 2 (TatD2). La reacció de RT-PCR s'ha realitzat partint de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25 i 27 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb SYBR® Safe. Com a control de càrrega s'ha realitzat en paral·lel la reacció de PCR per a la detecció del transcrit de *unr*. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

L'ADN nucleasa de tipus II (DNAsa II) dels mamífers té dues proteïnes homòlogues en *C. elegans*, NUC-1 (Wu et al., 2000b) i CRN-6 (Parrish and Xue, 2003). S'ha suggerit que tant CRN-6 com NUC-1 participen en la digestió d'ADN no necessari o forani en *C. elegans*, en els lisosomes o altres compartiments àcids (Lyon et al., 2000), encara que sembla que CRN-6 podria estar especialitzat per a la degradació apoptòtica d'ADN (Parrish and Xue, 2003). Així mateix, la DNAsa II en els mamífers s'ha involucrat en la degradació d'ADN de les cèl·lules apoptòtiques engolides pels macròfags (McIlroy et al., 2000). La detecció de l'eficàcia de la construcció shRNAi contra la DNAsa II s'ha realitzat per rtPCR en extractes de cardiomiòcits transduïts (**Fig. 50**).



**Figura 50.** Nivells del producte de transcripció de l'ADN nucleasa II (DNAsa II) en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o amb la construcció shRNAi per disminuir la transcripció DNAsa II (DNAsa II). Reacció de RT-PCR a partir de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25, 27 i 30 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb *SYBR® Safe*. La detecció en paral·lel del transcrit de *unr* s'ha utilitzat com a control de càrrega. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

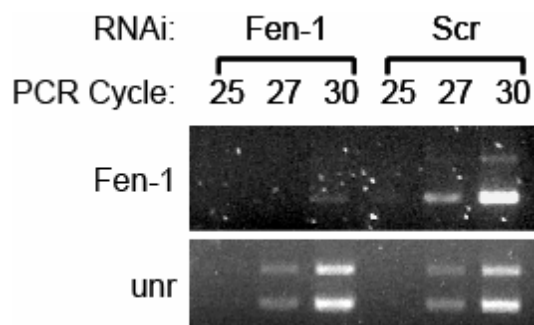
En línies cel·lulars de ratolí s'ha proposat que la topoisomerasa d'ADN de tipus II (Topo II) és la nucleasa responsable la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular, en col·laboració amb la nucleasa dependent de caspases CAD (Solovyan et al., 2002). Per tal de comprovar si Topo II està involucrada en la degradació de l'ADN en els cardiomiòcits de rata, juntament amb Endonucleasa G, hem construït el plàsmid lentiviral per a shRNAi de Topo II, que s'ha verificat per rtPCR (**Fig. 51**).



**Figura 51.** Nivells del producte de transcripció de l'ADN topoisomerasa II (Topo II) en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o cardiomiòcits deficients en Topo II (Topo II). La reacció de RT-PCR s'ha realitzat partint de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25, 27 i 30 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb *SYBR® Safe*. Com a control de càrrega s'ha realitzat en paral·lel la reacció de PCR per a la detecció del transcrit de *unr*. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

## Resultats

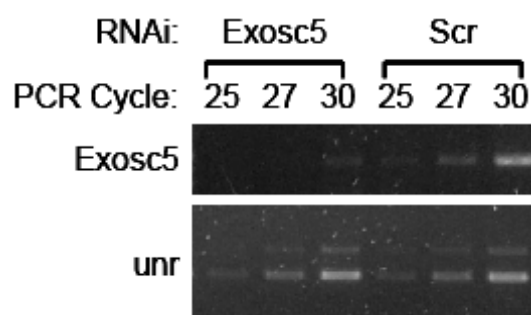
L'endonucleasa-1 FLAP (FEN-1, flap endonuclease-1) humana, i el seu homòleg en *C. elegans*, CRN-1, estan involucrats en els processos de replicació i reparació d'ADN, però també té un paper important durant la mort cel·lular programada. Estudis en el nemàtode *C. elegans* han mostrat que CRN-1 es localitza al nucli i que es pot associar i cooperar amb CPS-6 (homòleg d'EndoG) per a promoure la fragmentació d'ADN (Parrish et al., 2003). Donat que Fen-1 podria interaccionar amb EndoG, hem construït el plàsmid lentiviral per a shRNAi Fen-1, i així comprovar si intervé en la degradació de l'ADN durant la isquèmia cardíaca. Per tal de verificar l'eficàcia de la nostra construcció hem analitzat per rtPCR extractes d'ARN de cardiomiòcits transduïts amb la construcció control (Scr) i la construcció per a reprimir la transducció de Fen-1 (**Fig. 52**).



**Figura 52.** Nivells del producte de transcripció de Fen-1 en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o cardiomiòcits deficients en Fen-1. La reacció de RT-PCR s'ha realitzat partint de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25, 27 i 30 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb SYBR® Safe. Com a control de càrrega s'ha realitzat en paral·lel la reacció de PCR per a la detecció del transcrit de *unr*. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

El component 5 de l'exosoma (Exosome component 5, Ecosc5), també anomenat Rrp46 (Ribosomal RNA processing protein 46), forma part del complex de l'exosoma, que és un complex multiproteïc capaç de degradar diferents tipus d'ARN, i que s'ha observat que és crucial per a la supervivència dels llevats (Perumal and Reddy, 2002). L'homòleg de Exosc5 en *C. elegans* s'anomena CRN-5 i la disminució de la seva expressió en el nemàtode per la tècnica de shRNAi presenta un fenotip similar a la repressió de l'homòleg d'EndoG (CPS-6) (Parrish and Xue, 2003), i s'ha detectat interacció *in vitro* entre CPS-6, CRN-5 i d'altres nucleases que

podrien actuar en la mateixa via i formar un complex multiproteic, juntament amb components no apoptòtics com l'homòleg d'AIF, WAH-1 (Parrish and Xue, 2003). Per a comprovar aquesta possible interacció hem preparat la construcció del shRNAi de Exosc5, i hem verificat la seva eficàcia en cardiomiòcits al cap de 6 dies de la transducció per rtPCR (**Fig. 53**).

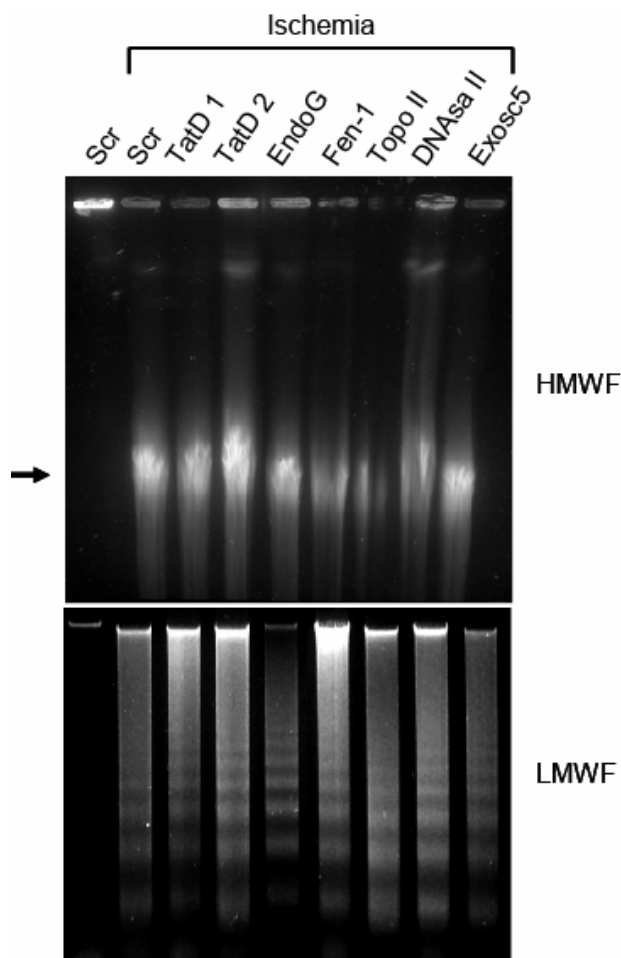


**Figura 53.** Nivells del producte de transcripció del component 5 de l'exosoma (Exosc5) en cardiomiòcits transduïts amb la construcció *scrambled* (scr) o amb la construcció shRNAi per disminuir la transcripció d'Exosc5. Reacció de RT-PCR a partir de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles 25, 27 i 30 de la reacció de PCR en gels d'agarosa al 3% tenyits amb SYBR® Safe. La detecció en paral·lel del transcrit de *untr* s'ha utilitzat com a control de càrrega. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

A pesar que en *C. elegans* s'ha detectat interacció entre els homòlegs de DNAsa II i EndoG (Parrish and Xue, 2003), i també entre els homòlegs de Fen-1 i EndoG (Parrish et al., 2003), i que a més es sap que DNAsa II actua en condicions acícliques, condició que també es dona durant la isquèmia en els cardiomiòcits, la repressió de l'expressió de DNAsa II i de Fen-1 en els cardiomiòcits en isquèmia no afecta de forma destacada al patró de degradació de l'ADN (**Fig. 54**).

Topoisomerasa II i Exosc5 han estat implicats en mort cel·lular apoptòtica. Topo II ha estat implicada en fragmentació d'ADN d'alt pes molecular en ratolí (Solovyan et al., 2002) i la repressió dels homòlegs d'Exosc5 i d'EndoG en *C. elegans* presenten fenotips molt similars (Parrish and Xue, 2003). No obstant això, la repressió d'ambdós gens en cardiomiòcits de rata en cultiu durant 16 hores de isquèmia no modifica el patró de degradació d'ADN (**Fig. 54**).

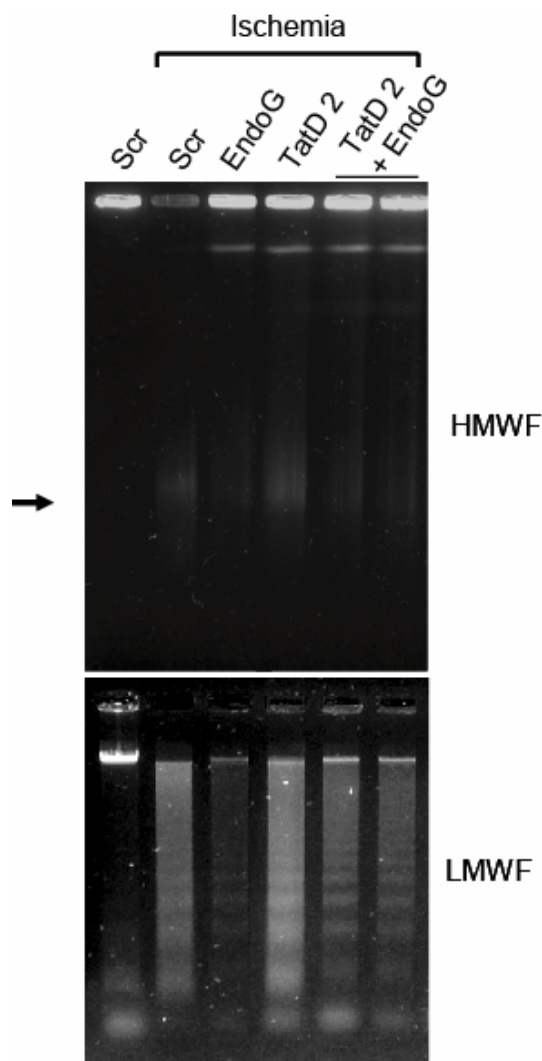




**Figura 54.** Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAis 1 i 2 de TatD (TatD 1 i TatD2), RNAi d'EndoG (EndoG), RNAi de Fen-1 (Fen-1), RNAi de Topo II (Topo II), RNAi de DNAsa II (DNAsa II) i RNAi d'Exosc5 (Exosc5) exposats a 16h de isquèmia. La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

En *C. elegans* s'ha observat que l'absència de TatD augmenta la reacció de TUNEL en el mutant per l'homòleg d'EndoG suggerint que ambdós podrien estar situats en vies diferents de degradació de l'ADN (Parrish and Xue, 2003), en els cardiomiòcits en isquèmia amb disminució de l'expressió de TatD es va observar un lleuger augment en la degradació de l'ADN (**Fig. 54**). Quan es reprimeixen endonucleasa G i TatD alhora (**Fig. 55**), la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular segueix el mateix patró que la repressió d'EndoG sol, però en canvi la degradació d'ADN de baix pes molecular augmenta lleugerament. Aquests canvis són bastant lleugers, i són difícils de discernir de la variabilitat metodològica, per la qual cosa

vam decidir de realitzar un curs temporal de isquèmia i a més provar un nou model de isquèmia.

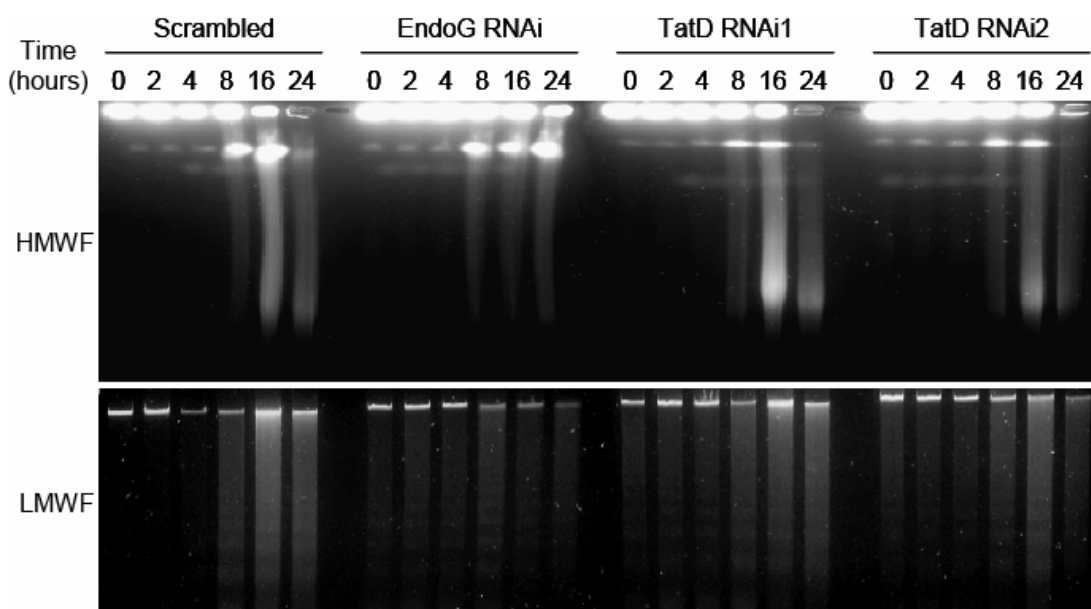


**Figura 55.** Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi d'EndoG (EndoG), RNAis 2 de TatD (TatD 2), RNAi 2 de TatD i d'EndoG alhora (TatD 2 + EndoG) i RNAi de Fen-1 (Fen-1) exposats a 16h de isquèmia. La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

El sistema utilitzat per aconseguir isquèmia en cultiu utilitzant la cambra hipòxica Billups-Rothengerg ha resultat ser poc eficient i perdurable, a més no ens permetia controlar la concentració d'O<sub>2</sub> al interior i augmentava la pressió atmosfèrica a la que eren sotmesos els cultius. L'adquisició d'una cambra hipòxica de la casa Biotrace (veure detalls a l'apartat de Materials i Mètodes), que controla la

## Resultats

temperatura, la concentració parcial d'oxigen i el nivell de pressió, ens ha permès aprofundir en el mecanisme d'aquestes nucleases. En concret de la nucleasa TatD, que és la única que en ser disminuïda la seva expressió presenta una menor degradació d'ADN de baix pes molecular (**Fig. 55**). En un curs temporal per a determinar d'eficàcia de la nova cambra hipòxica (**Fig. 56**), hem observat que la repressió d'EndoG no només prevé la degradació d'ADN de baix pes molecular sinó també prevé en gran part la degradació d'alt pes molecular, efecte que atribuïm a què en el model antic de cambra hipòxica l'augment de pressió provoca una fragmentació d'ADN d'alt pes molecular per algun altre mecanisme.



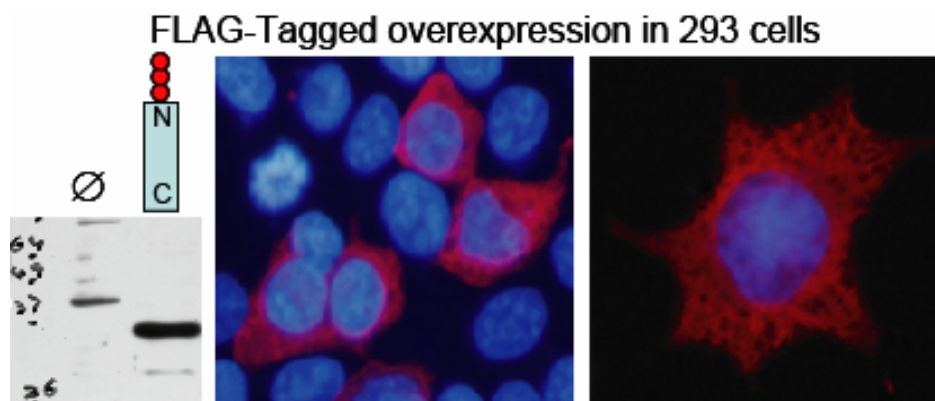
**Figura 56.** Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi d'EndoG (EndoG), RNAis 1 i 2 de TatD (TatD 1 i TatD 2), RNAi 2 de TatD i d'EndoG alhora (TatD 2 + EndoG) i RNAi de Fen-1 (Fen-1) exposats a un curs temporal de isquèmia entre 0 i 24 hores, en una atmosfera controlada a 0,2% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

La utilització de la cambra hipòxica amb pressió parcial d'oxigen controlada ens ha permès discernir que la repressió parcial de TatD no només no prevé la degradació d'ADN de baix pes molecular, sinó que l'augmenta (**Fig. 56**), suggerint una nova funció de TatD en la protecció de l'ADN de la degradació durant la mort cardiomiocitària en la isquèmia.

Així doncs, la conclusió lògica sembla que la recerca de la nucleasa responsable de la fragmentació de l'ADN és endonucleasa G, que resulta essencial per a tot el procés de fragmentació de l'ADN en els cardiomiòcits neonatals en isquèmia.

#### 8. Estudis preliminars de caracterització de la proteïna TatD

La recerca de la nucleasa responsable de la fragmentació de l'ADN en els cardiomiòcits isquèmics ens ha portat a l'estudi d'aquesta nucleasa amb aparent funció de protecció de l'ADN durant el dany isquèmic. Per al seu estudi s'ha realitzat el clonatge del gen *tatD* de ratolí en el plàsmid pcDNA3-FLAG3' a partir del seu clon IMAGE de manera idèntica al clonatge realitzat per al gen d'EndoG en el mateix plàsmid i que està detallat a l'apartat de Materials i Mètodes. La forma exògena de TatD-FLAG presenta una localització puntuada consistent amb una possible localització mitocondrial, tot i que l'excés de proteïna transduïda no permet discernir un patró clar en aquest tipus cel·lular, i la seva talla aparent detectada per Western Bot és inferior a 37kDa (**Fig. 57**).

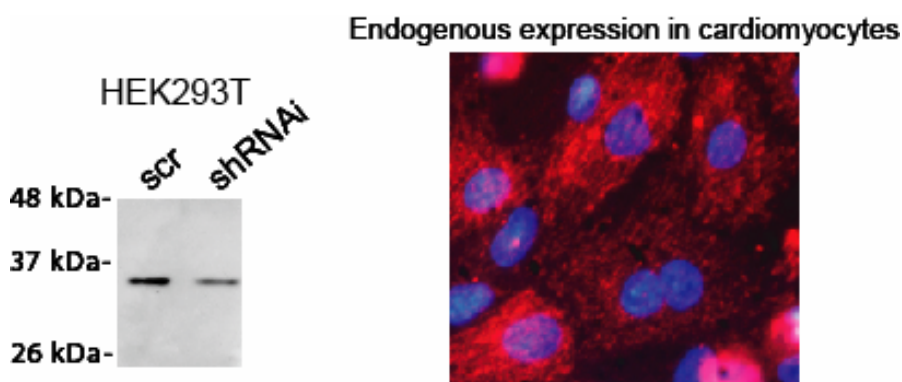


**Figura 57.** Transducció de la construcció TatD-FLAG en la línia cel·lular humana HEK293T. La cromatina s'ha tenyit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). En el panell dret mostra la immunodetecció de FLAG en cèl·lules HEK293 transduïdes amb la construcció TatD-FLAG. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

La manca de disponibilitat d'anticossos comercials contra la proteïna TatD ens ha portat a la producció d'un anticòs policlonal contra la proteïna de rata. Amb la qual hem verificat l'eficàcia de l'RNAi contra el gen *tatD* humà (**Fig. 58A**) en la línia cèl·lula humana HEK293T, on veiem que la construcció de shRNAi disminueix

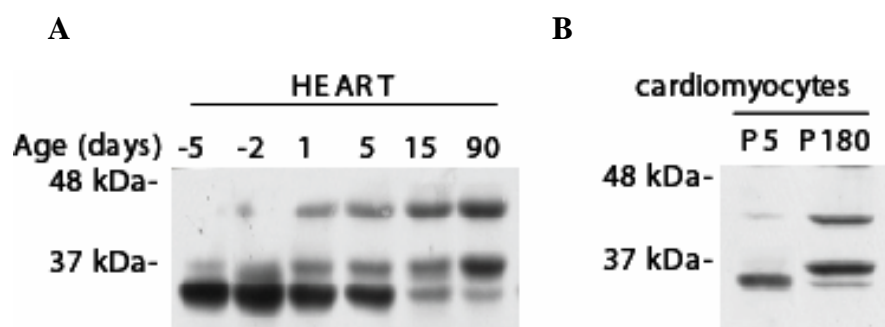
## Resultats

la proteïna TatD endògena, però només de forma lleugera. A més, confirmem que la talla de la proteïna endògena es troba per sota de 37kDa. La immunodetecció de TatD de rata endogen en cardiomiòcits neonatals en cultiu (**Fig. 58B**) mostra un patró puntuat, que ens indica una possible localització mitocondrial, tot i que no s'observa exclusió del nucli.



**Figura 58.** A) Immunodetecció per WB de TatD endogen en cèl·lules HEK293T transduïdes amb la construcció Scr o la construcció shRNAi de TatD. B) Immunocitoquímica contra TatD endogen (vermell) en cardiomiòcits no transduïts. La cromatina s'ha tenyit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). Les imatges són representatives de dos experiments independents.

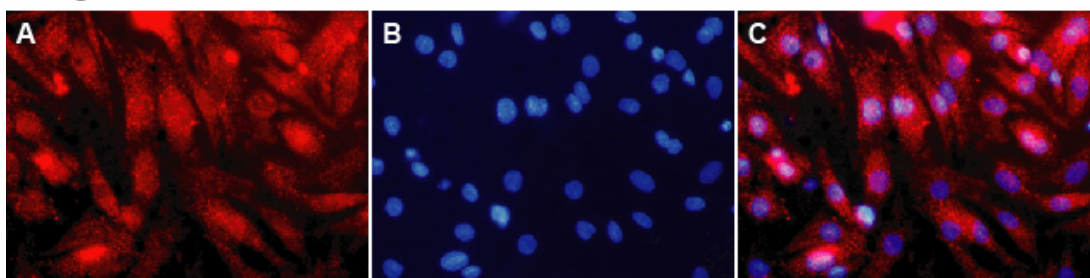
La caracterització d'aquesta proteïna al llarg del desenvolupament cardíac de rata ens indica que la proteïna TatD s'expressa en els diferents estadis del desenvolupament, però que experimenta algun tipus de modificació post-traducciona a partir del moment del naixement, ja que s'observa que al llarg del desenvolupament va augmentant la talla de les bandes detectades (**Fig. 59, A**). Hem comprovat l'eficàcia de l'anticòs utilitzant els 2 shRNAi de TatD de rata dels quals disposem, al igual que hem fet per TatD humà (**Fig. 58**), i podem descartar que les bandes observades siguin degudes a unions inespecífiques de l'anticòs (dades no mostrades). En cardiomiòcits de rata aïllats, neonatals i adults, s'observa el mateix patró de bandes observat en extractes totals de cor durant el desenvolupament (**Fig. 59, B**).



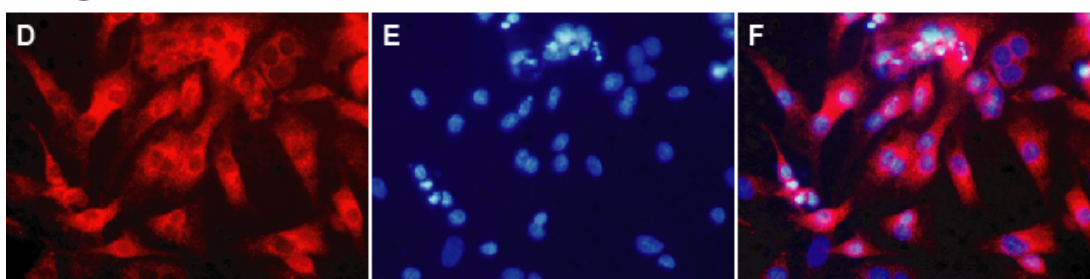
**Figura 59.** Immunodetecció de TatD endogen durant el desenvolupament cardíac en extractes totals de cor (A) i en cultius aïllats de cardiomiòcits neonatals i adults (B). Les imatges són representatives de tres experiments independents.

El patró de localització subcel·lular de TatD no coincideix amb el patró d'una proteïna de localització mitocondrial reconeguda, com és EndoG, sinó que s'observa clarament que TatD també es troba present al nucli, mentre que en el patró d'EndoG el nucli queda exclòs (**Fig. 60**). Podem descartar que la localització nuclear de TatD sigui un artefacte degut a l'anticòs secundari o al gruix dels cardiomiòcits, ja que la immunocitoquímica d'EndoG mostrada està realitzada utilitzant el mateix anticòs secundari i en el mateix tipus cel·lular i sí presenta exclusió nuclear.

#### endogenous TatD



#### endogenous EndoG



**Figura 60.** Tinció per immunofluorescència de TatD (panells A i C) i de EndoG (panells D i F). La cromatina es mostra en blau (panells B, C, E i F). Els panells C i F mostren la superposició dels panells anteriors. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

## *Resultats*

El treball mostrat en aquest apartat és un treball preliminar, que requereix d'un anàlisi més profund que no s'ha pogut incloure en la durada d'aquesta tesi. Caldrà analitzar en un curs temporal més acurat el procés de fragmentació d'ADN utilitzant ambdós RNAs, ja que els punts actuals disten 8 hores durant les quals podria haver-hi un pic de fragmentació que ja estigui de baixa en el següent punt. Estudiar quin és el mecanisme de modificació posttraduccional que afecta a la proteïna TatD durant el desenvolupament cardíac, i com realitza la funció protectora de l'ADN durant l'estímul isquèmic.

Objectiu 2. *Esbrinar els mecanismes implicats en la mort induïda per isquèmia en els cardiomiòcits, mitjançant l'estudi sistemàtic de les vies apoptòtiques conegudes en un model cel·lular de isquèmia.*

*c) Esbrinar la relació entre BNIP3 i EndoG, dues proteïnes mitocondrials apoptòtiques implicades en el processament de l'ADN induït per isquèmia.*

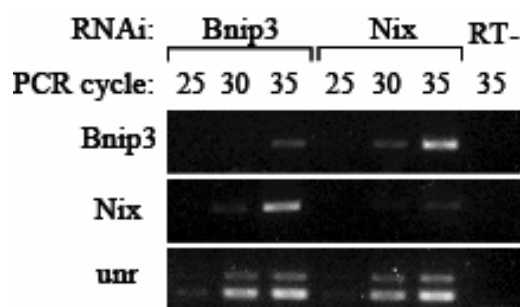




La nostra hipòtesi parteix de l'observació que la repressió de la fragmentació isquèmica d'ADN en absència d'EndoG en els cardiomiòcits que nosaltres hem observat en els apartats anteriors presenta un patró similar a la fragmentació de l'ADN de baix pes molecular en isquèmia en absència de BNIP3 en cardiomiòcits observada pel grup del Dr. Webster (Kubasiak et al., 2002; Webster et al., 2005). Cal remarcar que cap treball fins a la publicació del nostre article [(Bahi et al., 2006) (objectius 1 i 2a; ANNEX 2)] ha estudiat la fragmentació d'alt pes molecular en cèl·lules cardíques, per la qual cosa no es pot comparar totalment els patrons de fragmentació. El que ens ha portat a la hipòtesi següent: BNIP3, una proteïna proapoptòtica de la família de Bcl2 sense activitat nucleasa, controla o bé la sortida d'EndoG del mitocondri o bé la seva posterior translocació al nucli.

9. *BNIP3, però no Nix, dispara la fragmentació de l'ADN en els cardiomiòcits en isquèmia.*

Per una banda, la molècula BNIP3, un dels membres proapoptòtics de la família de Bcl2, s'ha implicat en la mort cel·lular programada independent de caspases (Vande Velde et al., 2000), i en la fragmentació d'ADN de baix pes molecular induïda per isquèmia en els cardiomiòcits (Kubasiak et al., 2002; Regula et al., 2002). D'altra banda, tot i que la proteïna Nix, una molècula BH3-only relacionada amb BNIP3, presenta també un paper proapoptòtic (Chen et al., 1999) i la seva expressió es veu augmentada en condicions de hipòxia en algunes línies cel·lulars (Bruick, 2000), no ha estat involucrada en l'apoptosi induïda per hipòxia.

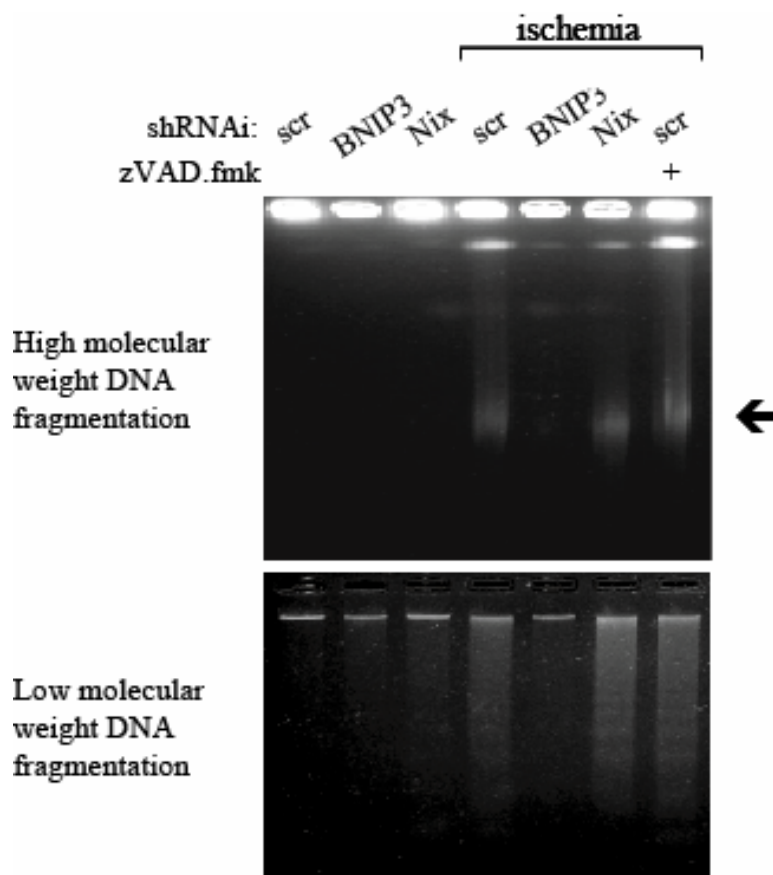


**Figura 61.** Nivells de producte de transcripció de BNIP3 i NIX en cardiomiòcits deficientes en NIX (*Nix*) o en BNIP3 (*Bnip3*). Reacció de RT-PCR realitzada a partir de 1 µg d'extractes d'ARN total. S'han carregat i migrat volums iguals dels productes de PCR extrets als cicles de PCR 25, 30 i 35 en

## Resultats

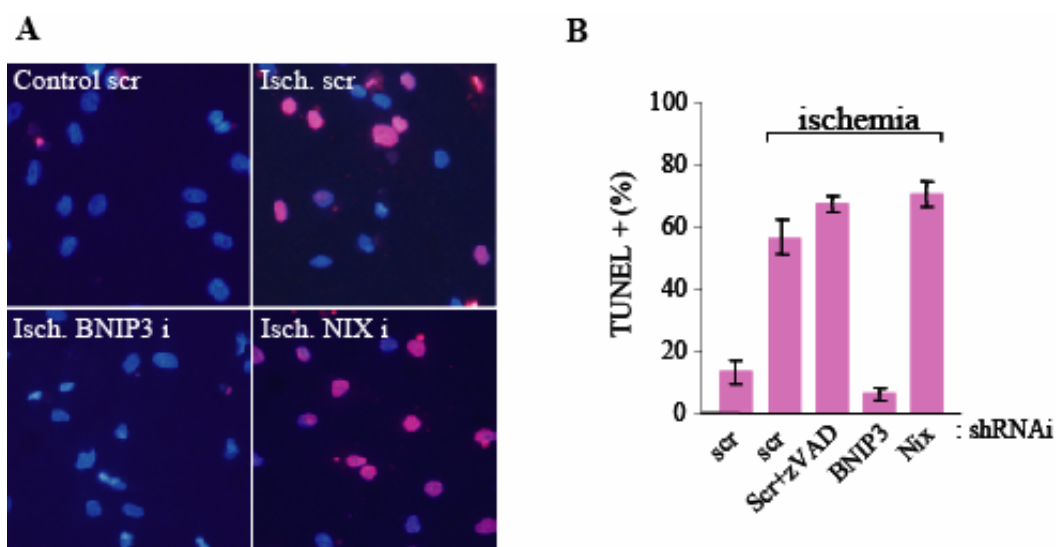
gels d'agarosa al 3% tenyits amb *SYBR® Safe*. Com a control de càrrega s'ha detectat el transcrit de *unr* en paral·lel. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

Utilitzant la interferència d'ARN (shRNAi) acoblada a la transducció dels cardiomiòcits per lentivirus hem pogut disminuir l'expressió dels gens *bnip3* i *nix* en cultius primaris de cardiomiòcits (**Fig. 61**). Els nostres resultats demostren que la manca de BNIP3 en cardiomiòcits tractats en condicions de isquèmia redueix la fragmentació d'ADN de baix i d'alt pes molecular, tot i que la manca de la proteïna homòloga NIX no és capaç de prevenir la degradació de l'ADN (**Fig. 62**).



**Figura 62.** La disminució en l'expressió de BNIP3 protegeix als cardiomiòcits diferenciats de la fragmentació d'ADN induïda durant la isquèmia. Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi de BNIP3 (BNIP3) i RNAi de NIX (Nix) en condicions control o exposats a 16h de isquèmia en una atmosfera controlada a 0,2% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> i en presència (+) o absència de 100 µM de z-VAD-fmk (zV). La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

La reacció de TUNEL marca fluorescentment aquelles cèl·lules que presenten discontinuïtats en l'ADN nuclear que tot sovint s'atribueixen a l'activitat de la nucleasa CAD (veure detalls en l'apartat de Materials i Mètodes). Els cardiomiòcits que tenen l'expressió de BNIP3 reduïda, no presenten reacció positiva de TUNEL, indicant que no hi ha fragmentació d'ADN en absència de BNIP3 als cardiomiòcits (**Fig. 63**).



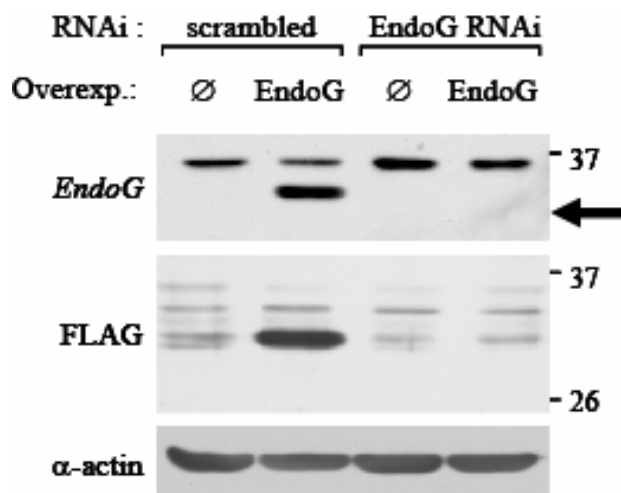
**Figura 63.** Reacció de TUNEL en cardiomiòcits neonatals en cultiu. A) Imatge de cardiomiòcits tenyits per la reacció de TUNEL en condicions control i durant 16 hores de isquèmia, transduïts amb la construcció Scr, amb l'RNAi de BNIP3 i amb l'RNAi de NIX. B) Recompte de cèl·lules positives per TUNEL respecte el nombre total de cèl·lules en el pou, expressat en percentatge de cèl·lules positives per TUNEL realitzat per duplicat en tres experiments independents. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

#### 10. Caracterització de la distribució de les formes exògenes i endògenes d'EndoG en cardiomiòcits i dels anticossos disponibles.

Tal com hem vist en apartats anteriors la isquèmia experimental en els cardiomiòcits induïx l'alliberament de la construcció EndoG-FLAG dels mitocondris cardiomiocitaris (**Fig. 41 i 42**). En els cardiomiòcits l'EndoG endogen es troba implicat en la degradació d'ADN independent de caspases induïda durant la isquèmia (**Fig. 46**). Hem utilitzat l'expressió de la construcció EndoG-FLAG per a detectar la translocació d'endonucleasa G perquè, almenys a les nostres mans, els anticossos comercials contra EndoG detecten una banda inespecífica d'un pes

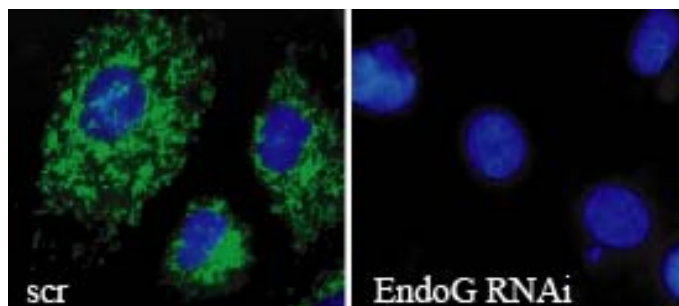
## Resultats

molecular aparent d'aproximadament 35kDa en extractes de rata i ratolí, mentre que la massa de la molècula de proEndoG és de uns 32kDa, i un cop tallada en el seu extrem N-terminal en de ser translocada al mitocondri presenta una massa molecular aparent de 29kDa (**Fig. 64**) (Schafer et al., 2004).



**Figura 64.** Anàlisi per Western Bot de l'eficàcia de sobreexpressió de la construcció EndoG-FLAG, mitjançant els anticossos comercials contra EndoG, i l'anticòs contra FLAG per a detectar la proteïna EndoG-FLAG sobreexpressada. La fletxa senyala la talla esperada per EndoG, que és inferior a la talla d'EndoG-FLAG. La proteïna cardíaca  $\alpha$ -actina s'utilitza com a control de càrrega. Les imatges són representatives de tres experiments independents utilitzant els tres anticossos comercials contra EndoG descrits a Materials i Mètodes.

Es va observar que la banda de 35kDa detectada pels anticossos comercials no es veu afectada per l'ús de la construcció de shRNAi per a la repressió gènica d'EndoG (**Fig. 64**), a pesar de la forta disminució observada a nivell de l'ARNm d'EndoG endogen (**Fig. 44**) i que la construcció shRNAi contra EndoG reprimeix completament la sobreexpressió de la construcció d'EndoG-FLAG, detectat per amb anticòs contra FLAG en Western Bot (**Fig. 64**) i per immunofluorescència en cardiomiòcits en cultiu (**Fig. 65**). Així doncs s'evidencia que els anticossos comercials disponibles detecten la proteïna sobreexpressada d'EndoG de ratolí i una banda inespecífica a 35kDa, però no detecten la proteïna endògena d'EndoG de rata.



**Figura 65.** Immunocitoquímica anti-FLAG (verd), en cardiomiòcits de rata postnats (dia 5) sobreexpressors de la construcció EndoG-FLAG transduïdes per la construcció scr o la construcció shRNAi d’EndoG. La cromatina s’ha tenyit utilitzant el colorant específic Hoechst (blau). Les imatges són representatives de tres experiments independents.

La sobreexpressió d’EndoG acoblada a la disminució de gens per shRNAi ocasiona alguns problemes metodològics, principalment que l’utilització d’ambdós disminueix la quantitat de EndoG-FLAG sobreexpressat. Hem solucionat aquest problema modulant la quantitat dels dos tipus de virus, fins aconseguir la mateixa sobreexpressió en tots els tractaments i comprovant en cada experiment individual l’eficàcia de l’RNAi, però això ens ha induït a sol·licitar la preparació d’un anticòs policlonal anti-EndoG. La seqüència polipeptídica (**Fig. 66**) contra la qual s’ha produït l’anticòs està diferent de la utilitzada en els anticossos comercials dels que disposem (ProScience, Sigma i Santa Cruz; veure referències a Materials i Mètodes).

```

Rn ATGCGCGCGCTACGGGCGGTTGACCTGGCGCTGGGCGCCGGCCTGGGCGCCGCGCA 60
Mm ATGCGCGCGCTGCGGGCCGGCCTGACCCTAGCGCTGGGCGCGGGCTGGGCGCCGCGCA 60
Hs ATGCGGGCGCTGCGGGCCGGCCTGACCCTGGCGTCCGGCGCGGGGCTGGGTGCGGTCGTC 60
*****

Rn GAGCATTGGCGGCGGCGAGAGGGTAA-----AGGGCCGGGGCTGCTGGGCCGAGTG 111
Mm GAGCATTTGGCGGCGGCGGAGGGCAA-----AGCGCCGGGGCTGCTGGGCCGAGTG 111
Hs GAGGGCTGGCGGCGGCGGCGGAGGACGCGCGGGCGGCGCCGGGACTGCTGGGCCGGCTG 120
***

Rn CCAGTGTGTCGGTTGTCGCGGC---CGATCTTCCC GCGCTGCCGGGGGACCGGCTGGC 168
Mm CCATTGTTGCCGTTGTCGCGGC---CGATCTTCCC GCGCTGCCGGGGGACCGGCGGGC 168
Hs CCCGTGCTGCCCGTGGCGGCGCAGCCGAGTTGCCCCCTGTGCCCGGGGACC--CCGC 177
                                     G G P R
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rn AGCACCGGAGAGTTGGCCAAGTACGGGCTGCCCGGCGTGGCGCAGCTCCGGAGCCGCGAG 228
Mm GGCACCGGGAACTGGCCAAGTACGGGCTGCCCGGCGTGGCGCAGCTCCGGAGCCGCGAG 228
Hs GGCCCCGGGCGAGCTGGCCAAGTACGGGCTGCCCGGGCTGGCGCAGCTCAAGAGCCGCGAG 237
G P G E L A K Y G L P
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rn TCCTACGTGCTGAGCTACGACCCGCGCACGCGGTCGCTCTGGGTGTTGGAGCAGCTG 288
Mm TCCTACGTGCTTAGCTACGACCCGCGCACGCGGTCGCTCTGGGTGTTGGAGCAGCTG 288
Hs TCGTACGTGCTGTGCTACGACCCGCGCACCCCGCGCGCTCTGGGTGTTGGAGCAGCTG 297
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

## Resultats

```

Rn AGGCCAGAGCGGCTCCGTGGCGATGGGGACCGTCGCGCCTGCGACTTCCACGAGGACGAT 348
Mm AGGCCAGAGCGGCTCCGTGGCGACGGGACCGTAGCGCCTGCGACTTCCGCGAGGATGAC 348
Hs CGACCCGAGCGTCTCCGCGCGACGGCGACCGGGCGAGTGGCGACTTCCGCGAGGACGAC 357
* * * * *

Rn TCTGTGCACGCGTACCACCGCGCCACCAATGCGGACTACCGGGCAGTGGCTTTGACCGC 408
Mm TCTGTGCACGCGTACCACCGCGCCACCAATGCGGACTACCGGGCAGTGGCTTTGACCGC 408
Hs TCGGTGCACGCGTACCACCGTGCCACCAACCGGACTACCGGGCAGTGGCTTCGACCGC 417
* * * * *

Rn GGCCACTTGGCGGCCCGCCCAATCACCGCTGGAGTCAGCGGGCCATGGACGACACCTTC 468
Mm GGCCATTTGGCGGCCCGCCCAACCACCGCTGGAGTCAGCGGGCCATGGACGACACCTTC 468
Hs GGTCACTTGGCGGCCCGCCCAACCACCGCTGGAGCCAGAGGCCATGGACGACACGTTTC 477
* * * * *

Rn TACCTGAGCAACGTAGCGCCTCAGGTGCCACACCTCAACCAGCATGCCTGGAACAACCTT 528
Mm TACCTGAGCAACGTAGCGCCTCAGGTGCCACACCTCAACCAGAATGCCTGGAACAACCTT 528
Hs TACCTGAGCAACGTAGCGCCTCAGGTGCCACACCTCAACCAGAATGCCTGGAACAACCTG 537
* * * * *

Rn GAGAAGTACAGCCGAGCTTGACTCGAACTTACCAAAAACGTTTATGTCTGCACAGGGCCT 588
Mm GAGAGGTACAGCCGAGCTTGACTCGAACTTACCAAAAATGTCTATGTCTGCACAGGGCCG 588
Hs GAGAAATATAGCCGAGCTTGACCCGACGTACCAAAAACGTTTATGTCTGCACAGGGCCA 597
* * * * *

Rn CTTTTCTGCCAGGACCGAGGCTGATGGAAAGTCCATGTGAAGTACCAGTTATTGGG 648
Mm CTTTTCTGCCAGGACCGAGGCTGATGGAAAGTCCATGTGAAGTACCAGTTATTGGG 648
Hs CTCCTTCTGCCAGGACAGAGGCTGATGGAAATCCTACGTAAAGTACCAGGTCATCGGC 657
* * * * *

Rn AAGAACCACGTGGCAGTGCCACACACTTCTTCAAGGTGTGATCCTGGAGGCAGCCAGT 708
Mm AAGAACCACGTGGCAGTGCCACACACTTCTTCAAGGTGTGATCCTGGAGGCAGCCAGT 708
Hs AAGAACCACGTGGCAGTGCCACACACTTCTTCAAGGTGTGATCCTGGAGGCAGCCAGT 717
* * * * *

Rn GGGCAAATCGAGCTCGGTTCCCTATGTGATGCCCAATGCCCGGTGGATGAGACTCTCCCT 768
Mm GGGCAGATCGAGCTACGTTCCCTACGTGATGCCCAATGCCCGGTGGATGAGACTCTCCCT 768
G Q I E L R S Y V M P N A P V D E T
Hs GGGCAAATGAGCTCCGCACCTACGTGATGCCCAACGCACCTGTGGATGAGGCCATCCCA 777
* * * * *

Rn TTGGAGCGCTTCTAGTGCCCATCGAGAGCATCGAGCGGGCCTCGGGATTGCTCTTCGTG 828
Mm CTGGAGCGGTTCTTGGTGCCCATCGAGAGCATCGAGCGGGCCTCGGGATTGCTCTTCGTG 828
Hs CTGGAGCGCTTCTTGGTGCCCATCGAGAGCATTGAGCGGGCCTCGGGGCTGCTCTTCGTG 837
* * * * *

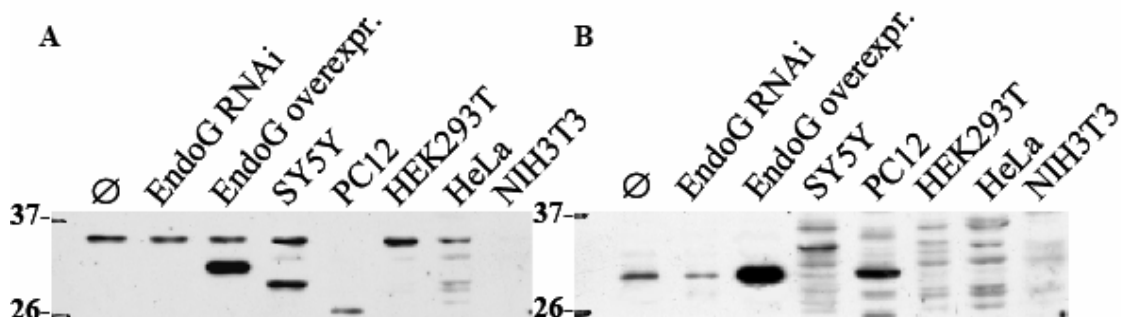
Rn CCCAATATTCTGGCTCGAGCTGGAAACCTCAAGGCATCACTGCTGGTAGCAAGTGA 885
Mm CCCAATATTCTGGCTCGAGCTGGAAACCTCAAGGCATCACTGCTGGCAGCAAGTGA 885
Hs CCAAACATCTGGCGGGCAGGCAGCCTCAAGGCATCACGGCGGGCAGTAAGTGA 894
* * * * *

```

**Figura 66. Seqüència del gen d'Endonucleasa G humà, de rata i de ratolí.** En groc està ressaltada la seqüència contra la qual es dirigeixen els tres anticossos comercials (específic contra EndoG humà però que les cases comercials asseguren que també detecta la proteïna de ratolí) i en verd la seqüència contra la qual es dirigeix el nostre anticòs (específic per a rata i ratolí; malgrat petits canvis en la seqüència nucleotídica, presenten idèntica seqüència d'aminoàcids). En color magenta es mostra la seqüència de 19 nucleòtids escollits per a shRNAi el gen d'endonucleasa G de rata i ratolí.

Hem verificat el nostre anticòs comparant-lo amb l'anticòs de Proscience, ja que tots els anticossos comercials disponibles (Sigma, Proscience, Santa Cruz) estan fets contra el mateix epítot. Hem observat que l'anticòs anti-EndoG que hem

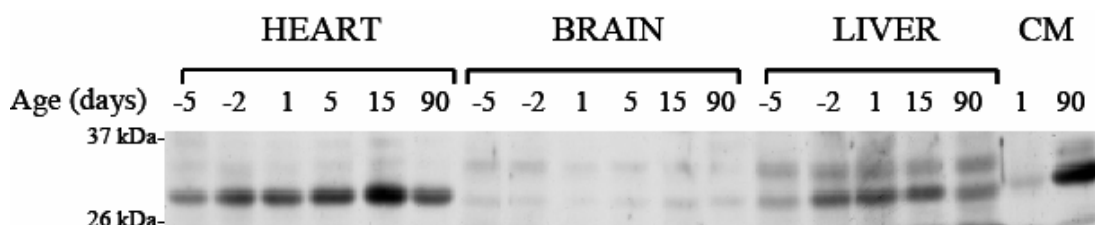
obtingut és específic per a detectar Endonucleasa G de rata, però no detecta EndoG endògena humana (línies cel·lulars HEK293T, HeLa i SY5Y) ni la proteïna endògena de ratolí (línia cel·lular NIH3T3), tot i que sí detecta la forma sobreexpressada d'EndoG de ratolí (**Fig. 67**).



**Figura 67.** Western Bot de diversos tipus cel·lulars utilitzant l'anticòs comercial anti-EndoG de Proscience (A) o utilitzant l'anticòs anti-EndoG que hem obtingut nosaltres (B). La sobreexpressió d'EndoG-FLAG, l'RNAi d'EndoG i el control no transfectat (Ø) s'han realitzat en cultius de cardiomiòcits neonatals de rata després de 6 dies de la transducció.

L'obtenció de l'anticòs anti-EndoG ens ha permès determinar, per mesures de densitometria de taques, que la nostra construcció d'RNAi contra EndoG disminueix en un 70% l'expressió endògena d'EndoG en cultius de cardiomiòcits transduïts *versus* els no transduïts (**Fig. 67**), que anteriorment només havíem mesurat a nivell del transcrit d'EndoG.

Durant el desenvolupament cardíac l'expressió d'EndoG es veu molt augmentada en el cor, tant en extractes totals de cor com en cultius de cardiomiòcits aïllats (**Fig. 68**), mentre que en el cervell, un tipus cel·lular que també és altament diferenciat, no es detecta pràcticament expressió d'Endonucleasa G.



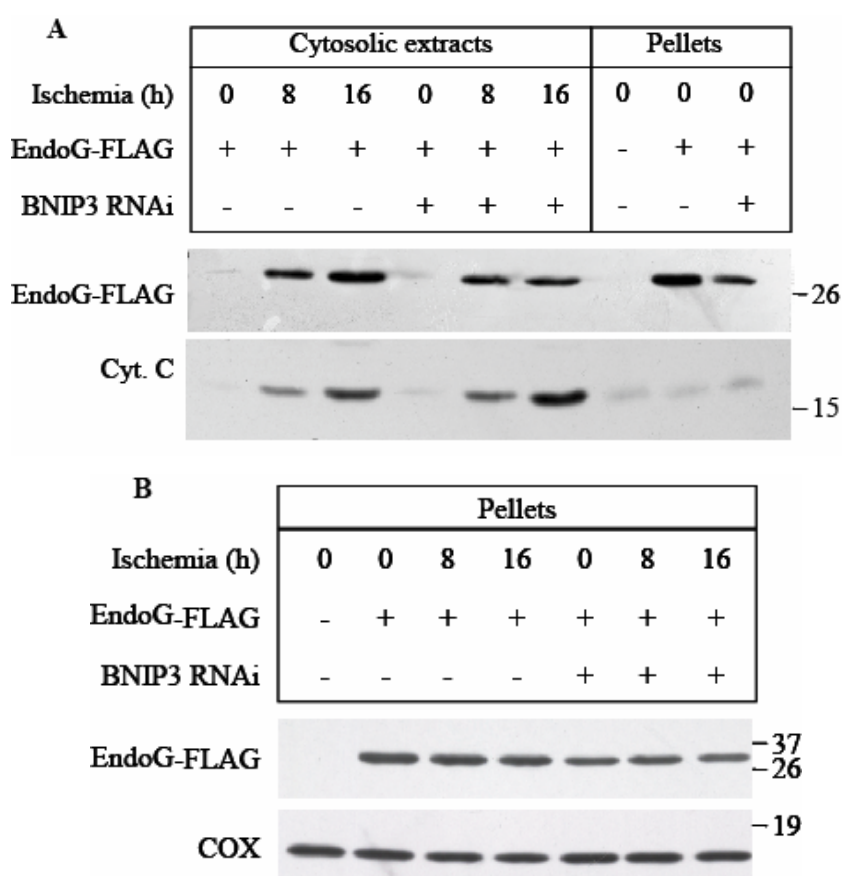
**Figura 68.** Caracterització de l'expressió d'EndoG endogen en extractes totals de cor (HEART), cervell (BRAIN) i fetge (LIVER) de rata durant el desenvolupament, i en cultius de cardiomiòcits neonatals (1 dia) i adults (90 dies). S'ha utilitzat l'anticòs que hem produït nosaltres.



## Resultats

11. *BNIP3 no indueix l'alliberament d'EndoG a nivell mitocondrial, tot i que demostrarem que BNIP3 i EndoG estan implicats en el mateix mecanisme de degradació de l'ADN.*

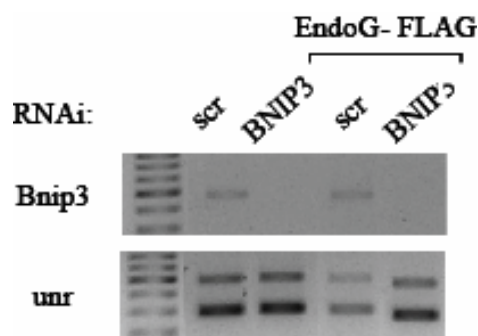
Els nostres resultats mostren que la repressió de l'expressió de la proteïna proapoptòtica BNIP3 endògena en cardiomiòcits en cultiu en isquèmia no pot bloquejar la sortida de la construcció EndoG-FLAG del mitocondri, ni tampoc la sortida de citocrom c (**Fig. 69, A**), refutant així la nostra hipòtesi inicial de que BNIP3 podria estar controlant la sortida de EndoG del mitocondri.



**Figura 69.** A) Immunodetecció de Citocrom c i FLAG en extractes citosòlics en un curs temporal de isquèmia en cardiomiòcits neonatals de rata transduïts amb EndoG-FLAG i la construcció Scr o la construcció shRNAi per a BNIP3. B) Control de càrrega en els pellets mitocondrials procedents dels mateixos extractes citosòlics, immunodetecció d'EndoG-FLAG i del marcador mitocondrial COX. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

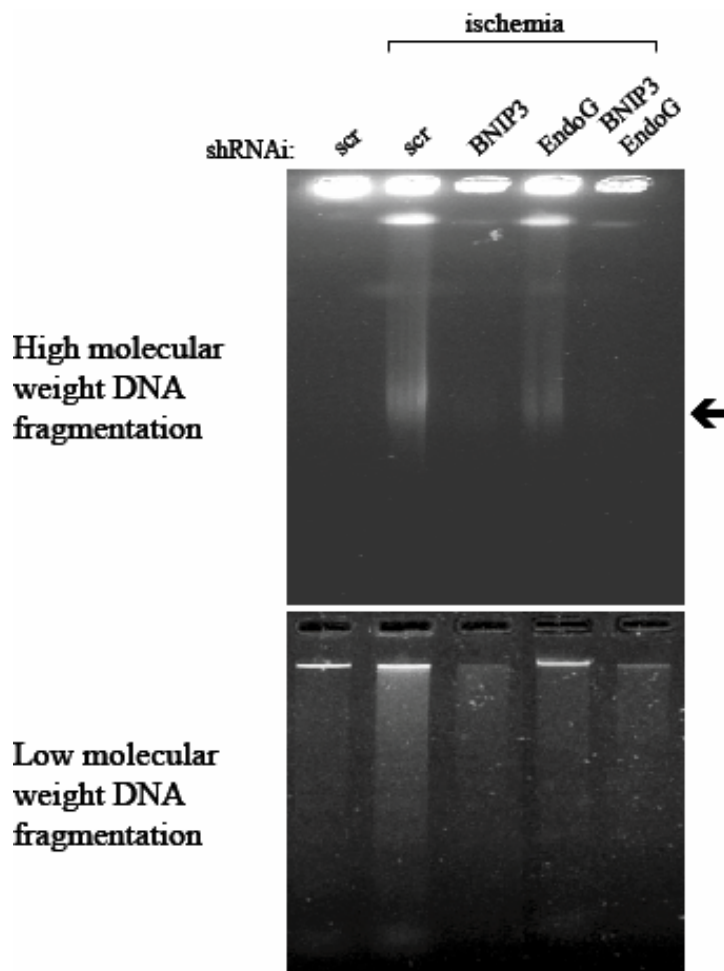
Hem comprovat que la transducció conjunta de shRNAi de BNIP3 i EndoG-FLAG no afecta a l'expressió de FLAG en els pellets mitocondrials de cada

experiment independent (**Fig. 69, B**), i hem verificat l'eficàcia del plàsmid lentiviral shRNAi per BNIP3 transduït sol o conjuntament amb el plàsmid lentiviral EndoG-FLAG en cardiomiòcits neonatals de rata per rt-PCR (**Fig. 70**), i per tal de descartar que la doble utilització de lentivirus disminueixi l'eficàcia del shRNAi de BNIP3 o de la sobreexpressió d'EndoG-FLAG en el nostre model.



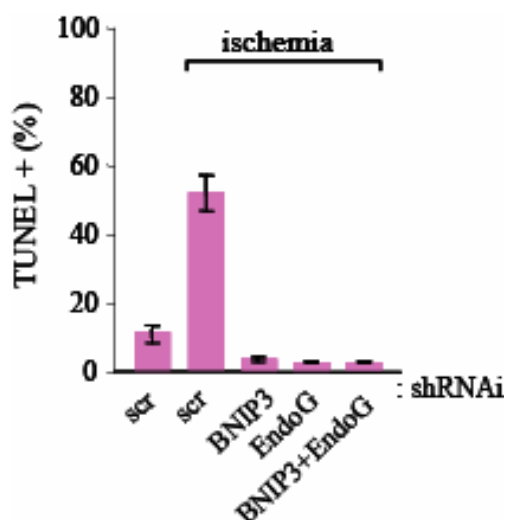
**Figura 70.** Detecció dels nivells de transcrit d'ARN de *Bnip3* per rtPCR en extractes d'ARN totals de cardiomiòcits neonatals transduïts únicament amb la construcció *Scr* o shRNAi de BNIP3, o conjuntament amb el plàsmid sobreexpressor per EndoG-FLAG. S'ha utilitzat el gen *unr* com a control de càrrega.

A pesar que no detectem efectes en l'alliberament al citosol d'EndoG en absència de BNIP3, el silenciament de l'expressió de la proteïna EndoG endògena mitjançant la construcció shRNAi bloqueja la fragmentació de l'ADN de baix i alt pes molecular tant detectada per electroforesi en gel d'agarosa (**Fig. 71**) com per reacció de TUNEL (**Fig. 72**), en un patró pràcticament idèntic al que s'observa en els cardiomiòcits isquèmics amb repressió de la molècula BNIP3. Sugerint així que, tot i que la relació entre BNIP3 i EndoG no es troba a nivell mitocondrial, podrien estar relacionats més endavant amb la mateixa via, ja que BNIP3 en absència d'EndoG no pot induir fragmentació de l'ADN en els cardiomiòcits en isquèmia i viceversa (**Fig. 71 i 72**).



**Figura 71.** La disminució en l'expressió de BNIP3 i/o de l'expressió d'EndoG protegeixen als cardiomiòcits diferenciats de la fragmentació d'ADN induïda durant la isquèmia. Detecció de la fragmentació d'ADN d'alt i baix pes molecular (HMWF i LMWF) en cardiomiòcits en cultiu transduïts amb les construccions *scrambled* (Scr), RNAi de BNIP3 (BNIP3), RNAi d'EndoG (EndoG) i d'ambdós RNAis alhora (BNIP3 + EndoG) en condicions control o exposats a 16h de isquèmia en una atmosfera controlada a 0,2% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. La fletxa senyala la banda a 50 kDa. Les imatges són representatives de tres experiments independents.

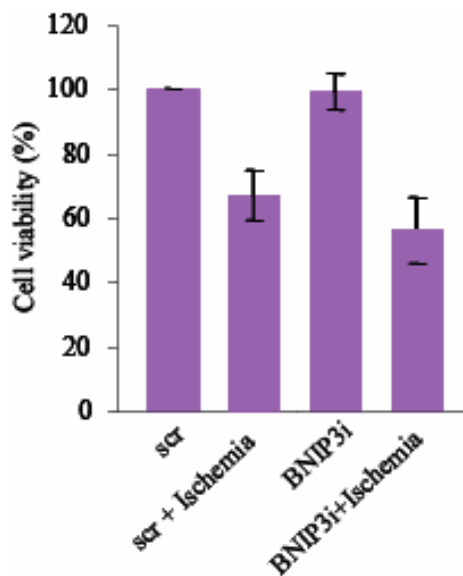
L'expressió d'endonucleasa G és la responsable de la producció de talls a l'ADN que són detectats en la reacció de TUNEL (**Fig. 72**), tècnica que ha estat erròniament utilitzada com a indicador de l'activitat de la nucleasa activada per caspases (CAD) i, per tant, com a indicador de l'activació de caspases en els cardiomiòcits (Olivetti et al., 1996; Bialik et al., 1997; Mehrhof et al., 2001; Gonzalez et al., 2007).



**Figura 72.** Reacció de TUNEL en cardiomiòcits neonatals en cultiu. Recompte de cèl·lules positives per TUNEL respecte el nombre total de cèl·lules en el pou expressat en percentatge de cèl·lules positives per TUNEL en cardiomiòcits neonatals de rata en condicions control i durant 16 hores de isquèmia, transduïts amb la construcció Scr, amb l'RNAi de BNIP3, amb l'RNAi d'EndoG i ambdues construccions alhora. Els experiments s'han realitzat per duplicat en tres experiments independents.

La repressió de BNIP3 en els cardiomiòcits neonatals en cultiu no afecta significativament a la viabilitat dels cultius de cardiomiòcits ni en condicions control ni en 16h de isquèmia (**Fig. 73**), treballs en neurones tampoc veuen diferències significatives de supervivència entre 0h i 24 hores de hipòxia en absència de BNIP3 (Zhang et al., 2007b), i l'estudi de la mida de l'infart en el ratolí *bnip3*<sup>-/-</sup> no varia respecte el control (Diwan et al., 2007), demostrant que l'absència de BNIP3 no augmenta la supervivència cardíaca durant la isquèmia. En un apartat anterior d'aquesta tesi hem observat que la repressió d'EndoG en 16 hores de isquèmia tampoc afecta a la viabilitat dels cardiomiòcits de rata en un curs temporal de isquèmia (**Fig. 46**). Aquests estudis de viabilitat ens indiquen que la prevenció del mecanisme de degradació de l'ADN, per eliminació de BNIP3 o d'EndoG, no pot augmentar la viabilitat dels cardiomiòcits en isquèmia, ja que lògicament en una situació de hipòxia sostinguda la cèl·lula resulta irremediablement danyada, fent que si aquesta no pot activar el mecanisme habitual de mort cel·lular n'activi d'altres d'alternatius.

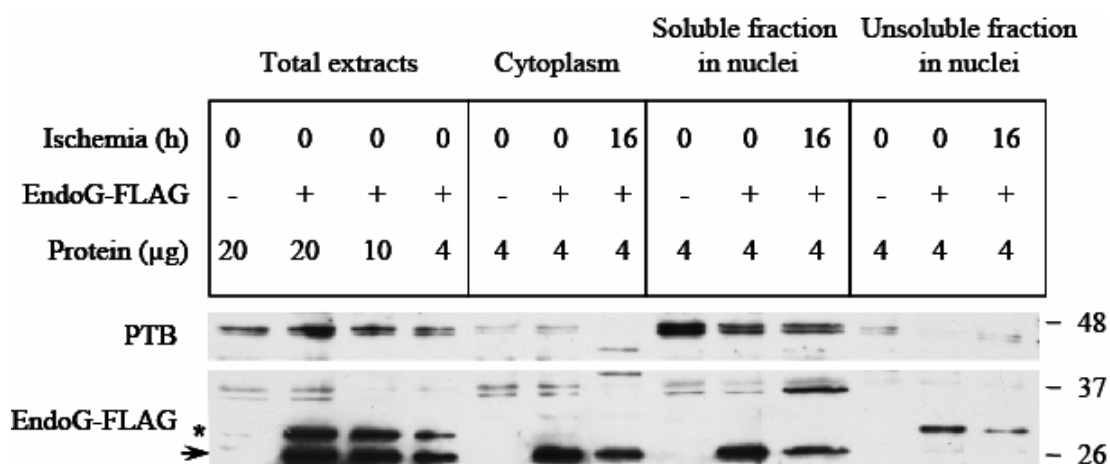
## Resultats



**Figura 73.** Recompte de viabilitat amb Blau Tripà, en cardiomiòcits neonatals transduïts amb la construcció Scr o shRNAi de BNIP3, en condicions normals o en 16h de isquèmia. Les dades són la mitjana  $\pm$ S.E. de tres experiments independents realitzats en duplicat. Les diferències observades no són significatives.

Així doncs, tot i que no hem pogut discernir el mecanisme pel qual BNIP3 i Endonucleasa G controlen el mateix procés de degradació de l'ADN durant la isquèmia cardíaca, sabem que ambdós són essencials per al mecanisme de degradació de l'ADN durant la isquèmia cardíaca, ja que sinó la repressió de només un dels dos no afectaria al patró de degradació de l'ADN observat ni a la reacció de TUNEL.

Una nova hipòtesi de treball, formulada al finalitzar ja aquesta tesi però abans de l'obtenció de l'anticòs anti-EndoG, seria que BNIP3 pugui controlar Endonucleasa G a nivell nuclear, que és on es dona la fragmentació de l'ADN. Aquest és un nou projecte que s'haurà de realitzar més endavant, i que serà molt més profitós ara que ja podem detectar EndoG endogen, ja que no hi haurà impediments per a realitzar shRNAi de BNIP3. No obstant, el nostre estudi preliminar de la distribució d'EndoG-FLAG en els cardiomiòcits durant la isquèmia ens ha mostrat que, per a la nostra sorpresa, EndoG-FLAG es localitza al nucli en condicions control no isquèmiques (**Fig. 74**). Hem utilitzat la proteïna nuclear PTB (polypymidine tract binding protein), que localitza a nucli i es troba unida a l'ARN, com a marcador de la fracció nuclear soluble.



**Figura 74.** Immunodetecció de FLAG en extractes de proteïna nuclear en condicions control i 16 hores de isquèmia en cardiomiòcits neonatals de rata transduïts amb EndoG-FLAG i la construcció Scr o la construcció shRNAi per a BNIP3. S'utilitza PTB (polypymidine tract binding protein) com a marcador de la fracció soluble nuclear. La fletxa assenyala la talla d'EndoG mitocondrial i l'asterisc la talla de proEndoG.

La troballa d'EndoG-FLAG al nucli en condicions control no està en desacord amb la bibliografia existent, ja que endonucleasa G va ser aïllada per primera vegada simultàniament en nuclis de timus de vedella (Ruiz-Carrillo and Renaud, 1987) i en mitocondris de cor de vedella (Cummings et al., 1987). També s'observa que en una situació de 16 hores de isquèmia EndoG-FLAG podria heterodimeritzar amb alguna proteïna donant una talla aparent més elevada, i que una forma d'EndoG més gran, potser abans del tall proteolític que li permet translocar al mitocondri, localitzada en la fracció nuclear insoluble podria trobar-se unida a alguna estructura nuclear (**Fig. 74**). No obstant tots aquests supòsits, la presència d'EndoG-FLAG al nucli podria ser un artefacte degut a l'ús d'una proteïna sobreexpressora, per la qual cosa és fa imprescindible realitzar un estudi acurat de la distribució subcel·lular (mitocondrial o nuclear) de la molècula d'EndoG endògena abans de poder extreure conclusions.



# Discussió

---





La pèrdua de massa cel·lular al miocardi no es pot compensar per renovació de cardiomiòcits (Anversa and Nadal-Ginard, 2002), la qual cosa s'ha observat que correlaciona amb un mal pronòstic del curs de la malaltia cardíaca. Tot i que la pèrdua de massa cardíaca tradicionalment sempre s'havia atribuït a necrosi, s'està començant a revelar la contribució de la mort apoptòtica a les malalties cardíques (Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1996; Foo et al., 2005).

Treballs del meu grup anteriors a la meua incorporació van demostrar que els cardiomiòcits neonatals tenen reduïda expressió d'Apaf-1 i que l'expressió transitòria d'Apaf-1 en els cardiomiòcits augmenta la susceptibilitat dels cardiomiòcits a la mort per Estaurosporina però és només un petit increment que pot ser inhibït per la proteïna antiapoptòtica Bcl<sub>x</sub>L (Sanchis et al., 2003), posteriorment altres grups han recolzat la nostra troballa d'expressió reduïda d'Apaf-1 en cardiomiòcits en cultiu (Potts et al., 2005). La repressió del gen Apaf-1 s'ha descrit en tumors resistents a apoptosi induïda per drogues (Jia et al., 2001; Soengas et al., 2001). A més, hi ha altres estudis que evidencien que la manca d'expressió d'Apaf-1 en les fibres musculars esquelètiques (Burgess et al., 1999) i en les neurones corticals adultes (Yakovlev et al., 2001) els hi confereix certa resistència a la mort. L'evidència que únicament la manca d'Apaf-1 no pot explicar la resistència dels cardiomiòcits a la mort cel·lular programada (MCP) va estimular la nostra recerca dels mecanismes moleculars implicats en la resistència a la mort dels cardiomiòcits.

### **El silenciament dels principals gens apoptòtics durant el desenvolupament cardíac s'associa a la manca d'activació de caspases durant la isquèmica cardíaca.**

Els resultats presentats en aquesta tesi mostren que el silenciament de la maquinària apoptòtica en els cardiomiòcits durant el desenvolupament, tant *in vivo* com *in vitro*, pot explicar l'absència de mort apoptòtica dependent de caspases durant la isquèmia cardíaca. Altres investigadors, treballant en biòpsies de cors humans isquèmics (Knaapen et al., 2001; Kostin et al., 2003; Corbucci et al., 2004), cors de conill *ex vivo* en isquèmia (Gottlieb et al., 1994; Ohno et al., 1998) i en cardiomiòcits aïllats de rata en isquèmia (Webster et al., 1999) tampoc poden detectar activació de caspases als cardiomiòcits, tot i que també detecten activació de caspases en cors de

## *Discussió*

ratolí embrionals (Knaapen et al., 2001). Aquests treballs estan d'acord amb la nostra observació que els cardiomiòcits perden l'expressió de les caspases durant el desenvolupament i per tant en els cardiomiòcits neonatals i adults no es detecta activació de caspases. Es més, treballs posteriors del grup no inclosos en aquesta tesi demostren que el silenciament de gens apoptòtics es dona en ratolí tant en cor com en el cervell [(Zhang et al., 2007a) i ANNEX 3], demostrant que el silenciament de gens apoptòtics no és un mecanisme exclusiu del cor sinó que es dona en tipus cel·lulars molt diferenciats i en estadis postmitòtics.

Durant el dany isquèmic els cardiomiòcits postnatsals no activen les caspases tant fàcilment com altres tipus cel·lulars (Scarabelli et al., 2002; Kostin et al., 2003; Corbucci et al., 2004). No obstant, els mecanismes moleculars subjacents no es coneixen bé degut a que tot sovint s'assumeix que les cèl·lules cardíques expressen una via dependent de caspases funcional. Varis investigadors detecten sortida de citocrom c i una petita activitat caspasa 3 en immunofluorescència en cors *ex vivo* que podrien ser degudes a fibroblasts o endoteli i/o reacció de TUNEL positiva, que els nostres resultats determinen que en els cardiomiòcits és degut a l'activitat d'EndoG i, erròniament, assumeixen que es dona formació de l'apoptosoma i mort dependent de caspases (Borutaite et al., 2003; Cai et al., 2003). Els nostres resultats demostren que efectivament es dona sortida de citocrom c durant la isquèmia en cardiomiòcits neonatals en cultiu tal com d'altres investigadors han aportat (Takatani et al., 2004), però tot i la sortida de citocrom c observada no s'indueix la formació de l'apoptosoma ni l'activació de caspasa 9. La nostra observació de que la sortida de citocrom c al citosol no és capaç d'induir apoptosi està en concordança amb estudis que mostren una sortida substancial de citocrom c no unida a una activació detectable de les caspases en cors humans amb cardiomiopaties (Narula et al., 1999; Scheubel et al., 2002), i que la microinjecció de citocrom c no induïx MCP en cardiomiòcits en cultiu (Potts et al., 2005).

### **La isquèmia cardíaca induïx la sortida de la forma truncada d'AIF dels mitocondris**

AIF és una proteïna mitocondrial sense activitat nucleasa pròpia que ha estat involucrada en la degradació d'ADN independent de caspases en la MCP tal com

Kroemer i col·laboradors han revisat (Kroemer and Martin, 2005). AIF es va descobrir per primera vegada com a un factor mitocondrial inductor d'apoptosi en ser alliberat al citosol (Susin et al., 1996). Al cap de poc es va descobrir que en ser alliberat del mitocondri AIF transloca al nucli i activa fragmentació perifèrica de la cromatina i digestió de la cromatina en fragments de  $\approx 50$ kpb de forma independent de caspases (Susin et al., 1999), però no es va detectar que AIF requeria un tall proteolític per a poder sortir del mitocondri fins al 2005. La forma mitocondrial d'AIF és de 62kDa i es troba inserida a la membrana mitocondrial interna. Estudis en mitocondris aïllats i en la línia cel·lular HeLa han mostrat que AIF per a ser alliberat del mitocondri necessita d'un tall proteolític que dona una forma citosòlica d'AIF de 57kDa (Otera et al., 2005; Polster et al., 2005). Amb la publicació dels nostres resultats el 2006 s'ha observat per primera vegada el truncament d'AIF endogen en un cultiu primari. Estudis en mitocondris aïllats de fetge i cervell han demostrat que el tall i alliberament d'AIF es pot produir per l'acció proteolítica de la caspasa dependent de calci Calpaïna I (Polster et al., 2005). Altres estudis amb mitocondris aïllats han demostrat que hi ha diferents mecanismes de tall d'AIF, que poden actuar de forma dependent o independent de calci, i que impliquen calpaïnes, proteases dependents de calci, i/o catepsines, proteases independents de calci (Yuste et al., 2005a). Recentment en un model neuronal de dany isquèmic s'ha demostrat un paper essencial de calpaïna I en el tall i alliberament d'AIF (Cao et al., 2007). Els nostres resultats en estudis d'integritat de l'ADN en cultius de cardiomiòcits neonatals en isquèmia utilitzant un inhibidor de calpaïnes no descarten la implicació de les calpaïnes en el tall d'AIF el nostre model però evidencien que no són les úniques proteases implicades en el processament d'AIF, potser conjuntament amb catepsines tal com alguns treballs han proposat (Yuste et al., 2005a).

### **Endonucleasa G, però no AIF, controla de la degradació de l'ADN de baix pes molecular en els cardiomiòcits en isquèmia**

La mort apoptòtica independent de caspases s'ha proposat com a mecanisme rellevant en la mort de les cèl·lules cardíaques en diverses patologies cardíaques com ara infart de miocardi, dany per reperfussió i diverses cardiomiopaties (Kang et al., 2000; Knaapen et al., 2001; Kostin et al., 2003).

## Discussió

El descobriment de la funció apoptòtica d'EndoG es va realitzar en estudis de fragmentació d'ADN *in vitro* en nuclis aïllats de la línia cel·lular HeLa (Li et al., 2001) i independentment en un *screening* genètic en *C. elegans* (Parrish et al., 2001). Endonucleasa G és una abundant nucleasa altament conservada que es localitza principalment al espai intermembrana mitocondrial (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993; Prats et al., 1997; Schafer et al., 2004; Widlak and Garrard, 2005), i que va ser aïllada per primera vegada en mitocondris de cor boví (Cummings et al., 1987) i en nuclis de timus boví (Ruiz-Carrillo and Renaud, 1987). Les funcions mitocondrials, no apoptòtiques, d'EndoG són amplies, prenent part en la replicació i reparació de l'ADN mitocondrial, i en la transcripció de l'ARN mitocondrial, entre d'altres (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993; Widlak et al., 2001). Els nostres resultats en immunocitoquímica recolzen que endonucleasa G s'expressa majoritàriament al mitocondri, tant en la proteïna endògena com en la proteïna sobreexpressada EndoG-FLAG.

Diverses molècules han estat implicades en la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular (HMWF), entre elles AIF, de la qual s'ha demostrat que participa en la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular (Susin et al., 1999); i que en ser alliberada del mitocondri promou HMWF en condicions independents de caspases i que indueix condensació nuclear de la cromatina de tipus I (Susin et al., 2000). Posteriors investigacions però apunten a què AIF no participa en la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular sinó que només participa en l'estadi I de la condensació de la cromatina al voltant de l'embolcall nuclear (Yuste et al., 2005b).

Estudis en el nemàtode *C. elegans* han demostrat que els homòlegs d'AIF i d'EndoG cooperen per tal de dur a terme la degradació apoptòtica de l'ADN de forma dependent de caspases (Wang et al., 2002), encara que en estudis en mamífers s'observa que ambdues molècules actuen de forma independent de caspases (Susin et al., 2000; Parrish et al., 2001). Els nostres resultats en cardiomiòcits en isquèmia mostren que la fragmentació d'ADN és un procés independent de caspases, dependent de la nucleasa EndoG però independent de la proteïna sense activitat nucleasa AIF. Aquesta troballa es troba en concordança amb els estudis recents que han demostrat que AIF no és essencial per a la fragmentació d'ADN d'alt pes (Yuste et al., 2005b), sinó només per a l'estadi I de fragmentació nuclear de la cromatina. La

proteïna AIF no té activitat nucleasa pròpia i, ja des del descobriment del seu paper apoptòtic, s'ha proposat que actuï a través de l'activació d'alguna nucleasa nuclear (Susin et al., 1999). Posteriorment es va identificar a la nucleasa PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase 1) com a la nucleasa activada per AIF en condicions apoptòtiques (Yu et al., 2002). La utilització de inhibidors de PARP-1 en cardiomiòcits neonatals en isquèmia no modifica el disminueix la fragmentació de l'ADN, confirmant la no implicació de PARP-1 i, indirectament, la d'AIF, en el patró de HMWF observat en els cardiomiòcits isquèmics.

Tot i que en cardiomiòcits neonatals podem afirmar la rellevància de l'activitat Endonucleasa G i la no implicació d'AIF, en d'altres models cel·lulars com són els fibroblasts de pell observem que la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular és independent de caspases i depèn d'AIF tal com ja ha estat descrit en d'altres tipus cel·lulars (Susin et al., 2000) i que, en canvi, en els fibroblasts de pell la fragmentació d'ADN de baix pes molecular és dependent de caspases i on l'activitat d'endonucleasa G no és essencial. En canvi, els fibroblasts cardíacs no moren durant 24h de isquèmia, gràcies a l'expressió constitutiva de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 que hem caracteritzat en estudis anteriors (Mayorga et al., 2004), la qual cosa està d'acord amb el descrit en la bibliografia sobre el paper dels fibroblasts en l'infart de miocardi, ja que està descrit que els fibroblasts cardíacs són els encarregats de sintetitzar la matriu extracel·lular que omple els buits deixats pels cardiomiòcits morts (Guyton and Hall, 2001).

Els resultats obtinguts amb la primera cambra hipòxica ens indicaven que Endonucleasa G només era responsable de la fragmentació d'ADN de baix pes molecular (LMWF), però no de la fragmentació d'alt pes molecular (HMWF). Després del canvi metodològic dut a terme al nostre laboratori, i que ens ha permès treballar en una estació de treball amb una pressió parcial d'oxigen molt més estable, hem pogut concloure que Endonucleasa G, en el model postmitòtic que són els cardiomiòcits neonatals, és responsable del processament de l'ADN en fragments grans de  $\approx 50$  kpb seguit del tall inter- i intra-nucleosomal de l'ADN, tal com estudis en nuclis aïllats tractats amb la forma recombinant humana d'EndoG han també demostrat (Widlak et al., 2001). Aquesta variació en els resultats obtinguts creiem que és deguda a què la primera cambra hipòxica provocava un augment de la pressió

## Discussió

considerable al interior de la cambra degut al mètode de gasseig que causava un dany a l'ADN que no era degut a la isquèmia, i que aquest factor de dany cel·lular no es dona en el nou model de la cambra hipòxica, observant-se només la degradació d'ADN causada per la hipòxia.

És important destacar que els estudis de mort cel·lular en els cardiomiòcits exclusivament s'han centrat en l'estudi de la fragmentació de l'ADN de baix pes molecular, i que el nostre treball ha estat el primer en publicar estudis de degradació de l'ADN d'alt pes molecular en cardiomiòcits. La manca d'aquests estudis pot portar a afirmacions errònies, ja que els nostres resultats en l'estudi de diverses nucleases ens mostren que sovint prevenir la formació del *ladder* no és sinònim d'evitar el dany a l'ADN, ja que la degradació de l'ADN pot estar en els estadis inicials de degradació portant a la formació de HMWF.

Per últim voldria remarcar que l'expressió d'EndoG es veu augmentada durant el desenvolupament cardíac tal com demostren els nostres estudis amb la proteïna endògena, a diferència del patró observat en les principals molècules de la maquinària apoptòtica dependent de caspases, trobant-se així en nivells elevats tant en extractes de cor adult com en cultius de cardiomiòcits adults. Per tant la importància d'EndoG en el dany a l'ADN induït per isquèmia observat en els cardiomiòcits neonatals possiblement serà molt rellevant també en els cardiomiòcits adults.

### **AIF podria estar involucrat en la protecció contra l'estrès oxidatiu induït per isquèmia i reperfussió en els cardiomiòcits**

Els resultats presentats en aquesta tesi mostren que la proteïna mitocondrial AIF juga un paper antiapoptòtic en la supervivència dels cardiomiòcits neonatals de rata durant la reoxigenació després d'un tractament curt de isquèmia. Aquests resultats estan en consonància amb la funció reguladora de la fosforil·lació oxidativa d'AIF descrita (Vahsen et al., 2004). El primer ratolí *knock out* per AIF és letal en estadis primerencs del desenvolupament embrional ja que no permet la cavitació de l'embrió (Joza et al., 2001), fet que no va permetre realitzar un estudi acurat de la funció d'AIF més enllà que concloure que era essencial per a la mort cel·lular programada en estadis embrionals primerencs, i que realitzava la seva funció de

forma independent a Apaf-1 i caspasa 9. El ratolí Harlequí (Hq) (Barber, 1971) duu una mutació espontània i ha estat utilitzat per l'estudi de l'estrès oxidatiu en neurones, i que posteriorment s'ha caracteritzat com a una mutació del gen d'*aif* degut a una inserció proviral en el primer intro del gen, que causa una disminució del 80-90% en l'expressió d'AIF (Klein et al., 2002; Klein and Ackerman, 2003). Aquest ratolí presenta una fenotip d'alopecia, que li dóna el nom, i d'atàxia, degut a la mort apoptòtica de les neurones del cerebel (Bronson et al., 1990).

La deficiència d'AIF en el ratolí Hq sensibilitza les neurones granulars del cerebel a la MCP induïda per peròxids, suggerint un paper d'AIF com a protector en front dels radicals lliures (Klein et al., 2002). En cardiomiòcits aïllats del ratolí Hq, que presenten fosforil·lació oxidativa deficient, s'ha demostrat que AIF protegeix els cardiomiòcits de l'estrès oxidatiu induït per isquèmia i reperfussió (van Empel et al., 2005). Aquest treball està d'acord amb els nostres resultats en els que observem que la repressió transitòria d'AIF per la tècnica de shRNAi en cardiomiòcits neonatals de rata en cultiu no afecta a la viabilitat durant la isquèmia però disminueix la seva supervivència durant el període de reoxigenació després de 2 hores de isquèmia. Estudis molt recents, que treballen amb un ratolí deficient en AIF específicament en el teixit muscular i en el fetge, han demostrat que l'absència de d'AIF provoca una disminució en la fosforil·lació oxidativa mitocondrial (Pospisilik et al., 2007), recolzant el paper d'AIF mitocondrial, en condicions no apoptòtiques, en la cadena respiratòria mitocondrial, així com el seu paper antioxidant proposats anteriorment (Vahsen et al., 2004; van Empel et al., 2005).

**Per a la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular no són essencials les nucleases Topoisomerasa II, DNAses I i II, Fen-1, Exosc5 i TatD; en canvi, Endonucleasa G ha revelat la seva implicació en les dues formes de degradació de l'ADN.**

La recerca de la/les nucleasa/es responsable/s que, en col·laboració amb EndoG, duen a terme la degradació de l'ADN en els cardiomiòcits en condicions isquèmiques ens ha portat a l'anàlisi de diverses nucleases, implicades de forma directa o indirecta amb Endonucleasa G o amb la degradació de l'ADN apoptòtica. Totes les nucleases estudiades en aquest apartat de la tesi, Topoisomerasa II, DNAses I i II, Fen-1, Exosc5 i TatD, han estat implicades en la degradació de l'ADN



## Discussió

en treballs en *C. elegans* (Parrish and Xue, 2003) i en d'altres treballs que també les han mencionat com a candidates per a la degradació apoptòtica de l'ADN.

Estudis del mecanisme molecular de degradació de l'ADN per part d'EndoG han revelat que aquest coopera juntament amb la nucleasa d'ADN de tipus I (DNAsa I) i amb exonucleasa, suggerint que DNAsa I produeix talls a l'ADN que faciliten l'acció d'EndoG (Oliveri et al., 2001; Widlak et al., 2001). Malgrat aquests indicis, en el nostre model de cardiomiòcits en isquèmia la DNAsa I no mostra un paper rellevant en el patró de degradació de l'ADN.

L'ADN nucleasa de tipus II (DNAsa II), la topoisomerasa de tipus II (Topo II) i AIF han estat implicades en la degradació apoptòtica de l'ADN en estudis *in vitro* (Zhang and Xu, 2002), però resta per a determinar la seva implicació real en la MCP *in vivo*. En el nostre model de cardiomiòcits neonatals en isquèmia, hem descartat la implicació de la molècula proapoptòtica AIF, tal com hem discutit en apartats anteriors. La DNAsa II és una endonucleasa lisosomal ubiqua que requereix d'un entorn acídic per tal de tallar l'ADN (Evans and Aguilera, 2003), similar a les condicions acídiques que es donen en cultius cel·lulars de cardiomiòcits en condicions isquèmiques (Webster et al., 1999; Kubasiak et al., 2002). S'ha observat que Topo II participa en la fragmentació de l'ADN d'alt pes molecular juntament amb CAD en línies cel·lulars de ratolí (Solovyan et al., 2002). Els nostres resultats no obstant descarten la implicació d'ambdues nucleases, DNAsa II i Topo II, en la fragmentació de l'ADN d'alt pes molecular en un model de cardiomiòcits neonatals en isquèmia.

L'endonucleasa-1 FLAP (FEN-1, flap endonuclease-1) està involucrada en la replicació i reparació de l'ADN i es localitza al nucli, però també se l'ha relacionat com a un possible candidat a la degradació apoptòtica de l'ADN en *C. elegans* en interacció amb l'homòleg d'EndoG a *C. elegans* (Parrish et al., 2003). En el mateix treball també es proposa a la nucleasa Exosc5, component del complex de l'exosoma, complex multiproteïc capaç de degradar l'ARN, i que s'ha observat que és crucial per a la supervivència dels llevats (Perumal and Reddy, 2002), com a possible nucleasa apoptòtica. No obstant, almenys en el nostre model d'estudi, hem descartat la seva implicació en la degradació de l'ADN durant la isquèmia.

En *E. coli* s'ha observat que TatD és una proteïna citoplasmàtica amb activitat DNAsa (Wexler et al., 2000), que podria estar implicada en la degradació apoptòtica d'ADN en *C. elegans* (Parrish and Xue, 2003) i en llevats (Qiu et al., 2005). De totes les nucleases estudiades en aquest apartat, la repressió de TatD és la única que presenta un patró de degradació diferent, però sorprenentment la repressió de la transcripció de TatD no disminueix la degradació apoptòtica de l'ADN sinó que l'augmenta lleugerament, suggerint que TatD és important per a la protecció de l'ADN durant un procés de mort isquèmic.

Tot i que en la primera part d'aquesta tesi només s'ha pogut demostrar que endonucleasa G era responsable de la fragmentació d'ADN de baix pes molecular induïda per isquèmia, els treballs posteriors amb millor control sobre la pressió i la concentració d'oxigen durant la hipòxia ens han permès desvelar que endonucleasa G controla tot el procés de degradació de l'ADN durant la isquèmia cardíaca, és a dir, endonucleasa G és responsable de la fragmentació d'alt i baix pes molecular observada en els cardiomiòcits en isquèmia. Així doncs, la recerca de la nucleasa responsable de la fragmentació d'ADN d'alt pes molecular ens ha portat a la conclusió que el procés de degradació de l'ADN en els cardiomiòcits isquèmics és un procés únic controlat per endonucleasa G. No obstant, la nostra recerca d'aquesta nucleasa no ha estat del tot infructuosa, ja que ens ha portat a iniciar estudis preliminars sobre la possible funció preventiva de la degradació de l'ADN de TatD.

### **Caracterització de TatD**

En els nostres estudis inicials en els cardiomiòcits neonatals en isquèmia hem observat que el patró de degradació de l'ADN en absència de TatD és poc clar. La innovació tecnològica que ha suposat l'adquisició d'una cambra hipòxica que ens permet controlar acuradament la pressió parcial d'oxigen al interior sense provocar un augment de la pressió interior ens mostra que la repressió de TatD en cardiomiòcits neonatals sota condicions isquèmiques, una nucleasa que consideràvem candidata a degradar l'ADN, lluny de prevenir la degradació de l'ADN, l'augmenta lleugerament; indicant-nos que TatD podria tenir una funció en la protecció de l'ADN durant la isquèmia cardíaca.

## Discussió

En aquest apartat només hem realitzat l'estudi preliminar de TatD i en cap cas pretenem aprofundir en l'estudi de la seva funció, sinó tant sols caracteritzar-ne la ubicació, mobilitat i possibles modificacions per tal d'establir unes bases sobre les quals en un futur realitzar un estudi en profunditat de TatD.

Els estudis fisiològics i funcionals sobre TatD existents en la bibliografia han estat realitzats tant sols en llevats i en *E. coli*, i es desconeixen les funcions i la localització subcel·lular en mamífers de TatD. En llevats s'ha vist que TatD és una proteïna citosòlica que presenta activitat nucleasa, i que no està involucrada en el sistema de transport Tat, tal com les seves proteïnes homòlogues TatA, TatB, TatC i TatE (Wexler et al., 2000). Els nostres resultats en immunofluorescència mostren una localització puntejada però difosa, que no exclou el nucli, indicant que una possible localització nuclear i citoplasmàtica de TatD. A més, observem que TatD manté la seva expressió en el cor adult i que a partir del període postnatal possiblement experimenta algun tipus de modificació post-traduccional que fa que augmenti el seu pes molecular aparent en gel d'electroforesi en condicions desnaturalitzants.

Per a la continuació d'aquest treball caldrà realitzar un nou curs temporal de isquèmia per a l'estudi de integritat de l'ADN més ajustat, amb temps més curts que ens permetran determinar bé el patró de fragmentació d'ADN en l'RNAi de TatD *versus* la construcció Scr. I també es realitzaran estudis de viabilitat en absència i presència de TatD per tal de determinar la importància de TatD en la supervivència en condicions de isquèmia i reperfussió.

### **BNIP3 controla la degradació de l'ADN dependent d'EndoG, però no indueix directament la sortida d'endonucleasa G del mitocondri**

BNIP3 és una proteïna mitocondrial de la família de Bcl2 de tipus BH3-only implicada en la mort cel·lular (Chen et al., 1997), la seva sobreexpressió en mamífers causa mort cel·lular independent de caspases (Vande Velde et al., 2000; Guo et al., 2001; Regula et al., 2002), augmenta el senyal de TUNEL (Vande Velde et al., 2000) i no indueix alliberament de citocrom c (Vande Velde et al., 2000; Guo et al., 2001). BNIP3 presenta una regió transmembrana que permet el seu ancoratge a la membrana mitocondrial (Ray et al., 2000), encara que BNIP3 també pot realitzar la seva funció proapoptòtica unit a membranes d'altres orgànuls cel·lulars (Ray et al.,

2000). L'expressió de BNIP3 és induïble per hipòxia (Bruick, 2000; Guo et al., 2001) i ha estat implicada en la degradació de l'ADN en la mort cel·lular induïda per hipòxia en cardiomiòcits en cultiu (Kubasiak et al., 2002; Regula et al., 2002). Recentment s'ha obtingut el ratolí *Bnip3* *-/-* (Diwan et al., 2007), amb el que s'han realitzat estudis *in vivo* de isquèmia i reperfussió que han determinat que BNIP3 no afecta a la grandària de l'infart immediatament després de produir-se el dany isquèmic, dades que concorden amb la nostra observació que la manca de BNIP3 no pot prevenir la mort cardiomiocitària induïda per isquèmia, i que contradiuen estudis en què el tractament amb un dominant negatiu de BNIP3 disminueix la mort cel·lulars induïda per isquèmia en cardiomiòcits en cultiu (Regula et al., 2002) i en cors *ex vivo* en reperfussió (Hamacher-Brady et al., 2007).

Tot i la implicació de BNIP3 en la degradació apoptòtica de l'ADN (Kubasiak et al., 2002), BNIP3 no té activitat nucleasa intrínseca, la qual cosa suggereix que actua mitjançant l'activació/alliberament d'alguna nucleasa. Els nostres resultats mostren que l'absència d'EndoG i de BNIP3 produeixen patrons de degradació de l'ADN durant la isquèmia cardíaca molt similars, i que ambdues molècules són essencials per a dur a terme aquesta degradació, ja que la manca d'un o altre disminueix visiblement el dany a l'ADN observat. Aquesta observació ens va portar a formular la hipòtesi que BNIP3, proteïna proapoptòtica de la família de Bcl2 associada al mitocondri, controlava la sortida d'Endonucleasa G del mitocondri en condicions de hipòxia. Malgrat tots els antecedents, hem observat que la sortida mitocondrial d'EndoG-FLAG no es veu afectada quan l'expressió de BNIP3 es troba disminuïda per mitjà d'una construcció shRNAi, i a més hem detectat que EndoG-FLAG podria estar localitzat al nucli en condicions basals. Tot i que no hem pogut esbrinar el mecanisme concret que relaciona EndoG i BNIP3, hem pogut confirmar que ambdós són rellevants per al control del dany a l'ADN en els cardiomiòcits neonatals, i possiblement també en el cor adult ja que hem demostrat que EndoG es troba altament expressat en el cor adult i estudis recents demostren l'expressió de BNIP3 en el cardiomiòcits adults (Hamacher-Brady et al., 2007).

En un futur, i gràcies a què recentment hem obtingut un anticòs contra la proteïna EndoG endògena, ens caldrà confirmar la distribució subcel·lular d'EndoG endogen en condicions control i isquèmiques i també l'efecte de la repressió de

## *Discussió*

BNIP3 mitjançant shRNAi sobre la localització d'EndoG en els cardiomiòcits en isquèmia per tal de verificar si BNIP3 controla o no la sortida d'EndoG del mitocondri o la seva acció en el nucli.

Aquesta part del nostre treball ens ha portat a constatar que la reacció de TUNEL observada en els cardiomiòcits és deguda a l'activitat independent de caspases d'Endonucleasa G, i no com a indicador de mort dependent de caspases tal com freqüentment s'ha utilitzat (Olivetti et al., 1996; Bialik et al., 1997; Mehrhof et al., 2001; Gonzalez et al., 2007). En cardiomiòcits isquèmics amb repressió de la transcripció de BNIP3 s'observa la desaparició total del senyal de TUNEL, igual que passa quan EndoG està reprimit, la qual cosa també ens indica que BNIP3 i EndoG estan relacionades en la mateix via, a pesar que nosaltres no haguem pogut clarificar en quin punt estan relacionades.

# Conclusions

---



1. L'expressió dels principals gens reguladors de la mort cel·lular dependent de caspases, així com de les caspases executores, és silenciada durant el desenvolupament cardíac en els cardiomiòcits.
2. La mort dels cardiomiòcits embrionals induïda per isquèmia o pel tractament amb drogues citotòxiques (estaurosporina) implica l'activació de caspases i segueix un patró morfològic apoptòtic, mentre que els cardiomiòcits postmitòtics moren de forma independent de caspases, adoptant una morfologia no apoptòtica que inclou condensació nuclear.
3. L'expressió d'Endonucleasa G i Apoptosis Inducing Factor (AIF) augmenta al miocardi durant la diferenciació.
4. Endonucleasa G és la principal responsable de la degradació de l'ADN als cardiomiòcits postmitòtics durant la isquèmia. En canvi, AIF sembla protegir la supervivència dels cardiomiòcits durant la reoxigenació.
5. La reacció de TUNEL, que s'utilitza comunament com a indicadora de mort cel·lular dependent de caspases, en els cardiomiòcits isquèmics és deguda a l'activitat independent de caspases d'Endonucleasa G.
6. La molècula proapoptòtica BNIP3, proteïna BH3-only de la família de Bcl2, controla la degradació de l'ADN dependent d'Endonucleasa G durant la isquèmia als cardiomiòcits postmitòtics, sense impedir l'alliberament d'Endonucleasa G del mitocondri.





# Referències

---



- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9:423-432.
- Acosta D, Ramos K (1984) Cardiotoxicity of tricyclic antidepressants in primary cultures of rat myocardial cells. *J Toxicol Environ Health* 14:137-143.
- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
- Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y (1994) Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 54:2468-2471.
- Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th Edition. New York: Garland Science.
- Alexander CS, Nino A (1969) Cardiovascular complications in young patients taking psychotropic drugs. A preliminary report. *Am Heart J* 78:757-769.
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22:207-220.
- Anversa P, Nadal-Ginard B (2002) Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415:240-243.
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 22:4385-4399.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Badorff C, Ruetten H, Mueller S, Stahmer M, Gehring D, Jung F, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest* 109:373-381.
- Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX, Sanchis D (2006) Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 281:22943-22952.
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9:550-555.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434:658-662.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ (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.
- Ballester M, Obrador D, Carrio I, Auge JM, Moya C, Pons-Llado G, Caralps-Riera JM (1990) Indium-111-monoclonal antimyosin antibody studies after the first year of heart transplantation. Identification of risk groups for developing rejection during long-term follow-up and clinical implications. *Circulation* 82:2100-2107.
- Ballester M, Obrador D, Carrio I, Moya C, Auge JM, Bordes R, Marti V, Bosch I, Berna-Roqueta L, Estorch M, et al. (1992) Early postoperative reduction of monoclonal antimyosin antibody uptake is associated with absent rejection-related complications after heart transplantation. *Circulation* 85:61-68.
- Bao Q, Shi Y (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14:56-65.
- Barber B (1971) Research news. *Mouse news letter* 45:34-35.
- Barefoot JC, Helms MJ, Mark DB, Blumenthal JA, Califf RM, Haney TL, O'Connor CM, Siegler IC, Williams RB (1996) Depression and long-term mortality risk in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 78:613-617.

## Referències

- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999) Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264:687-701.
- Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN (1997) Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 100:1363-1372.
- Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ, Hopp TP (1989) A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 264:5323-5326.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725-731.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11:529-541.
- Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Vershelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644:159-168.
- Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC (2003) Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 35:357-366.
- Brady HJ, Gil-Gomez G, Kirberg J, Berns AJ (1996) Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *Embo J* 15:6991-7001.
- Braunwald E (1997) Heart disease : a textbook of cardiovascular medicine, 5th Edition. Philadelphia: Saunders.
- Bronson RT, Lane PW, Harris BS, Davisson MT (1990) Harlequin (Hq) produces progressive cerebellar atrophy. *Mouse Genome* 87:110.
- Bruick RK (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9082-9087.
- Burgess DH, Svensson M, Dandrea T, Gronlund K, Hammarquist F, Orrenius S, Cotgreave IA (1999) Human skeletal muscle cytosols are refractory to cytochrome c-dependent activation of type-II caspases and lack APAF-1. *Cell Death Differ* 6:256-261.
- Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* 926:1-12.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts From Rodents Exposed to Intermittent Hypoxia or Erythropoietin Are Protected Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation* 108:79-85.
- Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AKF, Gao Y, Yin X-M, Clark RSB, Graham SH, Chen J (2007) Critical Role of Calpain I in Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor in Ischemic Neuronal Injury. *J Neurosci* 27:9278-9293.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727-737.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862.
- Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES, Shi Y (2001) Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 107:399-407.
- Chandrashekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I (2004) Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 43:295-301.

- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* 22:4132-4142.
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21:3704-3714.
- Chao W, Shen Y, Li L, Rosenzweig A (2002) Importance of FADD signaling in serum deprivation- and hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 277:31639-31645.
- Chattopadhyay A, Chiang CW, Yang E (2001) BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene* 20:4507-4518.
- Chen-Levy Z, Cleary ML (1990) Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem* 265:4929-4933.
- Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, Greenberg AH (1997) The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med* 186:1975-1983.
- Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A (1999) Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 274:7-10.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
- Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA (2002) Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem* 277:29181-29186.
- Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301:513-517.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8:705-711.
- Cheng N, Janumyan YM, Didion L, Van Hofwegen C, Yang E, Knudson CM (2004) Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival. *Oncogene* 23:3770-3780.
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995) Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 96:2247-2259.
- Chien KR (1999) Stress pathways and heart failure. *Cell* 98:555-558.
- Chipuk JE, Green DR (2005) Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:268-275.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396-1402.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010-1014.
- Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995a) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374:733-736.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ (1995b) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14:5589-5596.
- Chuang PI, Yee E, Karsan A, Winn RK, Harlan JM (1998) A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 249:361-365.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ (2002) Pleiotropic defects in

## Referències

- lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399.
- Churchill ME, Suzuki M (1989) 'SPKK' motifs prefer to bind to DNA A/T-rich sites. *Embo J* 8:4189-4195.
- Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg AH (2000) The *C. elegans* orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3- and caspase-independent mechanism. *Oncogene* 19:5453-5463.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:637-706.
- Corbucci GG, Perrino C, Donato G, Ricchi A, Lettieri B, Troncone G, Indolfi C, Chiariello M, Avvedimento EV (2004) Transient and reversible deoxyribonucleic acid damage in human left ventricle under controlled ischemia and reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology* 43:1992-1999.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.
- Cote J, Ruiz-Carrillo A (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261:765-769.
- Cregan SP, Dawson VL, Slack RS (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23:2785-2796.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 ( Pt 2):233-249.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M (2002) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 84:143-152.
- Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN (2004) The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 95:957-970.
- Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14:70-77.
- Cummings OW, King TC, Holden JA, Low RL (1987) Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 262:2005-2015.
- David KK, Sasaki M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL (2006) EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1147-1155.
- De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N (2002) Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 100:1310-1317.
- Deng X, Gao F, May WS, Jr. (2003) Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood* 102:3179-3185.
- Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC (2001) Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8:601-611.
- Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK (2003) Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118-125.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304.
- Di Lisa F, Bernardi P (2006) Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 70:191-199.
- Dice JF (1999) Lysosomal pathways of protein degradation. Austin: Landes Bioscience.
- Dinarello CA (2004) Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 10:201-222.
- Dinarello CA, Fantuzzi G (2003) Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 187 Suppl 2:S370-384.
- Diwan A, Krenz M, Syed FM, Wansapura J, Ren X, Koesters AG, Li H, Kirshenbaum LA, Hahn HS, Robbins J, Jones WK, Dorn GW (2007) Inhibition of ischemic

- cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest* 117:2825-2833.
- Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Bader M, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC, Dietz R, von Harsdorf R (2006) Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 113:1203-1212.
- Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11:543-549.
- Donovan M, Doonan F, Cotter TG (2006) Decreased expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members during retinal development and differential sensitivity to cell death. *Dev Biol* 291:154-169.
- Doonan F, Donovan M, Gomez-Vicente V, Bouillet P, Cotter TG (2007) Bim expression indicates the pathway to retinal cell death in development and degeneration. *J Neurosci* 27:10887-10894.
- Dornburg R, Pomerantz RJ (2000) HIV-1 gene therapy: promise for the future. *Adv Pharmacol* 49:229-261.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-467.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68:383-424.
- Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC, 3rd, Nunez G (1999) ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res* 85:e70-77.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3:1089-1095.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-935.
- Evans CJ, Aguilera RJ (2003) DNase II: genes, enzymes and function. *Gene* 322:1-15.
- Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO (2000) Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 79:871-882.
- Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Pare JC, Sacanella E, Fatjo F, Cofan M, Estruch R (2000) Diastolic function impairment in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1830-1835.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G (2002) Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci* 4:E12.
- Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005) Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115:565-571.
- Forte M, Bernardi P (2006) The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents? *Cell Death Differ* 13:1287-1290.
- Frost V, Delikat S, Al-Mehairi S, Sinclair AJ (2001) Regulation of p27KIP1 in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines involves non-apoptotic caspase cleavage. *J Gen Virol* 82:3057-3066.



## Referències

- Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275:39458-39465.
- Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H, Kano Y, Matsuda M (2000) Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 275:21661-21667.
- Galluzzi L, Kroemer G (2007) Mitochondrial apoptosis without VDAC. *Nat Cell Biol* 9:487-489.
- Galonek HL, Hardwick JM (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* 8:1317-1319.
- Galvez AS, Brunskill EW, Marreez Y, Benner BJ, Regula KM, Kirschenbaum LA, Dorn GW, 2nd (2006) Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress. *J Biol Chem* 281:1442-1448.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S (1996) bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13:665-675.
- Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ (1998) A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *Embo J* 17:7209-7218.
- Givol I, Tsarfaty I, Resau J, Rulong S, da Silva PP, Nasioulas G, DuHadaway J, Hughes SH, Ewert DL (1994) Bcl-2 expressed using a retroviral vector is localized primarily in the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum of chicken embryo fibroblasts. *Cell Growth Differ* 5:419-429.
- Gomez L, Chavanis N, Argaud L, Chalabreysse L, Gateau-Roesch O, Ninet J, Ovize M (2005) Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2153-2158.
- Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballesteros R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, Nunez G (1994) bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 120:3033-3042.
- Gonzalez A, Ravassa S, Loperena I, Lopez B, Beaumont J, Querejeta R, Larman M, Diez J (2007) Association of depressed cardiac gp130-mediated antiapoptotic pathways with stimulated cardiomyocyte apoptosis in hypertensive patients with heart failure. *J Hypertens* 25:2148-2157.
- Gonzalez J, Orlofsky A, Prystowsky MB (2003) A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells. *Blood* 101:2679-2685.
- Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94:1621-1628.
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartwig E, Steller H (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* 19:589-597.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA (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.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17:3878-3885.
- Guo K, Searfoss G, Krolkowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, Yu KT, Jaye M, Ivashchenko Y (2001) Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ* 8:367-376.

- Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT, Gottlieb RA (2004) Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem* 279:21233-21238.
- Guyton AC, Hall JE (2001) Tratado de fisiología médica, 10\* ed Edition. Madrid: : McGraw-Hill Interamericana.
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 14:146-157.
- Hawkins CJ, Wang SL, Hay BA (1999) A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of *Drosophila* IAP1 as an inhibitor of the *Drosophila* caspase DCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2885-2890.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA (2003) Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2351-2359.
- Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H (2001) Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104:781-790.
- Inserte J, Garcia-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J (2005) Calpain-Mediated Impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity During Early Reperfusion Contributes to Cell Death After Myocardial Ischemia. *Circ Res* 97:465-473.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer J-L, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
- Irvine RA, Adachi N, Shibata DK, Cassell GD, Yu K, Karanjawala ZE, Hsieh CL, Lieber MR (2005) Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol Cell Biol* 25:294-302.
- Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V (2005) A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387:659-667.
- Janiak F, Leber B, Andrews DW (1994) Assembly of Bcl-2 into microsomal and outer mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 269:9842-9849.
- Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, Cheng N, Soucie EL, Penn LZ, Andrews D, Knudson CM, Yang E (2003) Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *Embo J* 22:5459-5470.
- Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin KM (2000) Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 102:915-920.
- Jia L, Srinivasula SM, Liu FT, Newland AC, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Kelsey SM (2001) Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 98:414-421.
- Jiang W, Davidson JR (2005) Antidepressant therapy in patients with ischemic heart disease. *Am Heart J* 150:871-881.
- Jones JM, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, Davies E, Hajnoczky G, Saunders TL, Van Keuren ML, Fernandes-Alnemri T, Meisler MH, Alnemri ES (2003) Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* 425:721-727.
- Joza N, Kroemer G, Penninger JM (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends in Genetics* 18:142-149.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY,

## Referències

- Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549-554.
- Kamer I, Sarig R, Zaltsman Y, Niv H, Oberkovitz G, Regev L, Haimovich G, Lerenthal Y, Marcellus RC, Gross A (2005) Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 122:593-603.
- Kang MJ, Koh GY (1997) Differential and dramatic changes of cyclin-dependent kinase activities in cardiomyocytes during the neonatal period. *J Mol Cell Cardiol* 29:1767-1777.
- Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S (2000) Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res* 87:118-125.
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443:658-662.
- Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164:493-499.
- Karkkainen S, Peuhkurinen K (2007) Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 39:91-107.
- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160:53-64.
- Kelly DP, Strauss AW (1994) Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 330:913-919.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Khalil PN, Neuhof C, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof H, Fritz H, Siebeck M (2005) Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur J Pharmacol* 528:124-131.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8:1348-1358.
- Kim J, Klionsky DJ (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69:303-342.
- Kim PK, Janiak-Spens F, Trimble WS, Leber B, Andrews DW (1997) Evidence for multiple mechanisms for membrane binding and integration via carboxyl-terminal insertion sequences. *Biochemistry* 36:8873-8882.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14:5579-5588.
- Klein JA, Ackerman SL (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 111:785-793.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419:367-374.
- Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM (2001) Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51:304-312.
- Knochel JP (1983) Cardiovascular effects of alcohol. *Ann Intern Med* 98:849-854.
- Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ (2001) Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice. *Cancer Res* 61:659-665.
- Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG (1998) Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:2307-2315.

- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427:461-465.
- Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G (1998) ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5156-5160.
- Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92:715-724.
- Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA (1989) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5227-5231.
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3516-3520.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53:4701-4714.
- Kroemer G, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-730.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99-163.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1463-1467.
- Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA (2002) Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12825-12830.
- Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:691-699.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311:847-851.
- Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, Vallette FM (2007) Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 12:887-896.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14:44-55.
- Lee P, Sata M, Lefter DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN (2003) Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H456-463.
- Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ (2000) Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* 101:1634-1637.
- Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA (2002) Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 4:769-781.

## Referències

- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:183-192.
- Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM (1996) Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 28:1737-1746.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W-X, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000) The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Molecular Cell* 6:1389-1399.
- Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ (1996) Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9545-9552.
- Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W (2000) Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ* 7:1218-1224.
- Lisi S, Mazzon I, White K (2000) Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. *Genetics* 154:669-678.
- Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A (1994) The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 5:411-417.
- Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408:1004-1008.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- Lyon CJ, Evans CJ, Bill BR, Otsuka AJ, Aguilera RJ (2000) The *C. elegans* apoptotic nuclease NUC-1 is related in sequence and activity to mammalian DNase II. *Gene* 252:147-154.
- Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS (2007) BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms. *Dev Cell* 12:221-234.
- Marti V, Ballester M, Udina C, Carrio I, Alvarez E, Obrador D, Pons-Llado G (1995) Evaluation of myocardial cell damage by In-111-monoclonal antimyosin antibodies in patients under chronic tricyclic antidepressant drug treatment. *Circulation* 91:1619-1623.
- Martinon F, Tschopp J (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14:10-22.
- Martins LM, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, Abuin A, Grau E, Geppert M, Livi GP, Creasy CL, Martin A, Hargreaves I, Heales SJ, Okada H, Brandner S, Schulz JB, Mak T, Downward J (2004) Neuroprotective Role of the Reaper-Related Serine Protease HtrA2/Omi Revealed by Targeted Deletion in Mice. *Mol Cell Biol* 24:9848-9862.
- Mathews CK, Holde KEv (1998) *Bioquímica*, 2ª ed Edition. Madrid [etc.]: : McGraw-Hill.

- Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J (2007) Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 100:914-922.
- Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K, Nakamura Y (1998) Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer* 21:230-235.
- May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA, Davidson NE (1994) Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 269:26865-26870.
- Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D (2004) Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem* 279:34882-34889.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79-88.
- McIlroy D, Tanaka M, Sakahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S (2000) An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14:549-558.
- Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R, von Harsdorf R (2001) In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 104:2088-2094.
- Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R (1994) Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3754-3758.
- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277:45162-45171.
- Mukhopadhyay P, Batkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Hasko G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P (2007) Pharmacological Inhibition of CB1 Cannabinoid Receptor Protects Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology* 50:528-536.
- Muller O, Sattler T, Flotenmeyer M, Schwarz H, Plattner H, Mayer A (2000) Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J Cell Biol* 151:519-528.
- Myers C (1998) The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 25:10-14.
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13:619-624.
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.
- Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA (1997) Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest* 100:2362-2370.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Nam YJ, Mani K, Ashton AW, Peng CF, Krishnamurthy B, Hayakawa Y, Lee P, Korsmeyer SJ, Kitsis RN (2004) Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol Cell* 15:901-912.
- Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T (2000) Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 25:177-181.

## Referències

- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA (1996) Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335:1182-1189.
- Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S (1999) Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8144-8149.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153:1265-1276.
- Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z (2003) The microRNA world: small is mighty. *Trends in Biochemical Sciences* 28:534-540.
- Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 280:25060-25070.
- Neuss M, Monticone R, Lundberg MS, Chesley AT, Fleck E, Crow MT (2001) The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function. *J Biol Chem* 276:33915-33922.
- Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ, Shore GC (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268:25265-25268.
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA (2002) siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8:681-686.
- O'Reilly LA, Harris AW, Strasser A (1997) bcl-2 transgene expression promotes survival and reduces proliferation of CD3-CD4-CD8- T cell progenitors. *Int Immunol* 9:1291-1301.
- Obrador D, Ballester M, Carrio I, Moya C, Bosch I, Marti V, Berna L, Estorch M, Udina C, Marrugat J (1994) Presence, evolving changes, and prognostic implications of myocardial damage detected in idiopathic and alcoholic dilated cardiomyopathy by <sup>111</sup>In monoclonal antimyosin antibodies. *Circulation* 89:2054-2061.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-1058.
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603:113-128.
- Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (1998) "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation* 98:1422-1430.
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:211-216.
- Okamura T, Miura T, Takemura G, Fujiwara H, Iwamoto H, Kawamura S, Kimura M, Ikeda Y, Iwatate M, Matsuzaki M (2000) Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 45:642-650.
- Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A (2001) DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 31:743-751.
- Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P (1996) Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28:2005-2016.

- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K (2005) Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *Embo J* 24:1375-1386.
- Pandey S, Wang E (1995) Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2, and RB phosphorylation, resembling events of early cell-cycle traverse. *J Cell Biochem* 58:135-150.
- Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D (2007) Potentiation of Doxorubicin Cardiotoxicity by Iron Loading in a Rodent Model. *Journal of the American College of Cardiology* 49:2457-2464.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412:90-94.
- Parrish JZ, Xue D (2003) Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol Cell* 11:987-996.
- Parrish JZ, Xue D (2006) Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development. *Chromosoma* 115:89-97.
- Parrish JZ, Yang C, Shen B, Xue D (2003) CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *Embo J* 22:3451-3460.
- Passer BJ, Nancy-Portebois V, Amzallag N, Prieur S, Cans C, Roborel de Climens A, Fiucci G, Bouvard V, Tuynder M, Susini L, Morchoisne S, Crible V, Lespagnol A, Dausset J, Oren M, Amson R, Telerman A (2003) The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2284-2289.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939.
- Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155:725-731.
- Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM (1984) A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7166-7170.
- Penninx BW, Beekman AT, Honig A, Deeg DJ, Schoevers RA, van Eijk JT, van Tilburg W (2001) Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry* 58:221-227.
- Perumal K, Reddy R (2002) The 3' end formation in small RNAs. *Gene Expr* 10:59-78.
- Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 76:725-734.
- Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, Olejniczak ET, Meadows RP, Mack J, Swift K, Matayoshi ED, Zhang H, Thompson CB, Fesik SW (2000) Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* 9:2528-2534.
- Piotr Widlak WTG (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry* 94:1078-1087.
- Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280:6447-6454.



## Referències

- Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, Ebersberger I, Nakashima T, Sarao R, Neely G, Esterbauer H, Kozlov A, Kahn CR, Kroemer G, Rustin P, Burcelin R, Penninger JM (2007) Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131:476-491.
- Potts MB, Vaughn AE, McDonough H, Patterson C, Deshmukh M (2005) Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J Cell Biol* 171:925-930.
- Prats E, Noel M, Letourneau J, Tiranti V, Vaque J, Debon R, Zeviani M, Cornudella L, Ruiz-Carrillo A (1997) Characterization and expression of the mouse endonuclease G gene. *DNA Cell Biol* 16:1111-1122.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-296.
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293:1829-1832.
- Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y (1999) Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399:549-557.
- Qiu J, Yoon JH, Shen B (2005) Search for apoptotic nucleases in yeast: role of Tat-D nuclease in apoptotic DNA degradation. *J Biol Chem* 280:15370-15379.
- Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB (2002) Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* 3:932-939.
- Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, Diez J (2000) Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 36:1065-1071.
- Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 275:1439-1448.
- Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA (2002) Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res* 91:226-231.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14250-14255.
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907.
- Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:405-413.
- Riedl SJ, Li W, Chao Y, Schwarzenbacher R, Shi Y (2005) Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* 434:926-933.
- Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104:791-800.
- Roose SP (2003) Treatment of depression in patients with heart disease. *Biol Psychiatry* 54:262-268.
- Rubin E (1979) Alcoholic myopathy in heart and skeletal muscle. *N Engl J Med* 301:28-33.
- Ruetten H, Badorff C, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects. *J Am Coll Cardiol* 38:2063-2070.
- Ruiz-Carrillo A, Renaud J (1987) Endonuclease G: a (dG)n X (dC)n-specific DNase from higher eukaryotes. *Embo J* 6:401-407.

- Sakamaki K, Inoue T, Asano M, Sudo K, Kazama H, Sakagami J, Sakata S, Ozaki M, Nakamura S, Toyokuni S, Osumi N, Iwakura Y, Yonehara S (2002) Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ* 9:1196-1206.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:401-410.
- Sanchis D, Mayorga M, Ballester M, Comella JX (2003) Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Differ* 10:977-986.
- Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275:983-986.
- Sawada M, Hayes P, Matsuyama S (2003) Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol* 5:352-357.
- Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, Latchman DS (2002) Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 90:745-748.
- Schaefer KS, Doughman YQ, Fisher SA, Watanabe M (2004) Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn* 229:489-499.
- Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A, Meiss G (2004) Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* 338:217-228.
- Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D, Holtz J (2002) Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol* 39:481-488.
- Seglen PO, Bohley P (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48:158-172.
- Shall S, de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1-15.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-470.
- Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y (2003) Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11:519-527.
- Shu H-B, Halpin DR, Goeddel DV (1997) Casper Is a FADD- and Caspase-Related Inducer of Apoptosis. *Immunity* 6:751-763.
- Simpson NH, Singh RP, Emery AN, Al-Rubeai M (1999) Bcl-2 over-expression reduces growth rate and prolongs G1 phase in continuous chemostat cultures of hybridoma cells. *Biotechnol Bioeng* 64:174-186.
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207-211.
- Solovyan VT, Bezvenyuk ZA, Salminen A, Austin CA, Courtney MJ (2002) The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. *J Biol Chem* 277:21458-21467.
- Sommer JR, Waugh RA (1978) Ultrastructure of heart muscle. *Environ Health Perspect* 26:159-167.
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61:6669-6673.

## Referències

- Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, Salmena L, Hakem R, Straus S, Lenardo M (2005) Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307:1465-1468.
- Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279:52726-52734.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184:1331-1341.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192:571-580.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A Serine Protease, HtrA2, Is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death. *Molecular Cell* 8:613-621.
- Taegtmeyer H (2002) Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation* 106:2043-2045.
- Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C949-953.
- Takeda K, Yu ZX, Nishikawa T, Tanaka M, Hosoda S, Ferrans VJ, Kasajima T (1996) Apoptosis and DNA fragmentation in the bulbus cordis of the developing rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 28:209-215.
- Taloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B (2002) Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:190-195.
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406:902-906.
- Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M (2003) Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 59:428-440.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272:17907-17911.
- Tinel A, Tschopp J (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304:843-846.
- Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carrillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M (1995) Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three

- human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* 25:559-564.
- Trono D (2000) HIV-based vectors: getting the best out of the worst. *J Gene Med* 2:61-63.
- Tsujimoto Y (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195:158-167.
- Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S (2006) Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757:1297-1300.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.
- U'Prichard DC, Greenberg DA, Sheehan PP, Snyder SH (1978) Tricyclic antidepressants: therapeutic properties and affinity for alpha-noradrenergic receptor binding sites in the brain. *Science* 199:197-198.
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *Embo J* 23:4679-4689.
- van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de Wit E, Sluiter W, Ackerman SL, De Windt LJ (2005) Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ Res* 96:e92-e101.
- Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 20:5454-5468.
- Vander Heiden MG, Thompson CB (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1:E209-216.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9:267-276.
- Vaux DL, Silke J (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:287-297.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10:2859-2869.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298:1587-1592.
- Watanabe M, Jafri A, Fisher SA (2001) Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. *Dev Biol* 240:274-288.
- Watanabe M, Choudhry A, Berlan M, Singal A, Siwik E, Mohr S, Fisher SA (1998) Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. *Development* 125:3809-3820.
- Webster KA, Graham RM, Bishopric NH (2005) BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 38:35-45.
- Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, Hernandez O, Sato B, Bishopric NH (1999) Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 104:239-252.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-2071.

## Referències

- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730.
- Weld FM, Bigger JT, Jr. (1980) Electrophysiological effects of imipramine on ovine cardiac Purkinje and ventricular muscle fibers. *Circ Res* 46:167-175.
- Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, Palmer T (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* 275:16717-16722.
- Widlak P, Garrard W (2005) Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 94:1078-1087.
- Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* 276:48404-48409.
- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617-625.
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (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.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007) Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-859.
- Wollert KC, Heineke J, Westermann J, Ludde M, Fiedler B, Zierhut W, Laurent D, Bauer MK, Schulze-Osthoff K, Drexler H (2000) The cardiac Fas (APO-1/CD95) Receptor/Fas ligand system : relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation* 101:1172-1178.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139:1281-1292.
- Wride MA, Lapchak PH, Sanders EJ (1994) Distribution of TNF alpha-like proteins correlates with some regions of programmed cell death in the chick embryo. *Int J Dev Biol* 38:673-682.
- Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y (2000a) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408:1008-1012.
- Wu YC, Stanfield GM, Horvitz HR (2000b) NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* 14:536-548.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14:180-198.
- Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, Faden AI (2001) Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21:7439-7446.
- Yan N, Wu JW, Chai J, Li W, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim. *Nat Struct Mol Biol* 11:420-428.
- Yan XX, Najbauer J, Woo CC, Dashtipour K, Ribak CE, Leon M (2001) Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol* 433:4-22.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y (1998) Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97:276-281.

- Yeh ETH, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand J-B, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS (2004) Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation* 109:3122-3131.
- Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW (2000) Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12:633-642.
- Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279:1954-1958.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:886-891.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94:739-750.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7:673-682.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263.
- Yu X, Acehan D, Menetret JF, Booth CR, Ludtke SJ, Riedl SJ, Shi Y, Wang X, Akey CW (2005) A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure* 13:1725-1735.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75:641-652.
- Yuste VJ, Moubarak RS, Delettre C, Bras M, Sancho P, Robert N, d'Alayer J, Susin SA (2005a) Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death Differ* 12:1445-1448.
- Yuste VJ, Sanchez-Lopez I, Sole C, Moubarak RS, Bayascas JR, Dolcet X, Encinas M, Susin SA, Comella JX (2005b) The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J Biol Chem* 280:35670-35683.
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183:1533-1544.
- Zandy AJ, Lakhani S, Zheng T, Flavell RA, Bassnett S (2005) Role of the executioner caspases during lens development. *J Biol Chem* 280:30263-30272.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O (2001) Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193:247-254.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-628.
- Zhang J, Xu M (2002) Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends Cell Biol* 12:84-89.
- Zhang J, Bahi N, Zubiaga AM, Comella JX, Llovera M, Sanchis D (2007a) Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues. *FEBS Lett* 581:5781-5786.
- Zhang J, Dong M, Li L, Fan Y, Pathre P, Dong J, Lou D, Wells JM, Olivares-Villagomez D, Van Kaer L, Wang X, Xu M (2003) Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15782-15787.

## Referències

- Zhang Z, Yang X, Zhang S, Ma X, Kong J (2007b) BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia. *Stroke* 38:1606-1613.
- Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, Guyton RA (2003) Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* 59:132-142.
- Zinkel S, Gross A, Yang E (2006) BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13:1351-1359.
- Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, Abtahi FM, Gross A, Korsmeyer SJ (2005) A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 122:579-591.
- Zinkel SS, Ong CC, Ferguson DO, Iwasaki H, Akashi K, Bronson RT, Kutok JL, Alt FW, Korsmeyer SJ (2003) Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev* 17:229-239.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (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.
- Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:139-176.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-11556.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, 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.
- Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martinez A, del Rio JA, Soriano E, Vodrazka P, Kuner R, Groene HJ, Herr I, Krammer PH, Martin-Villalba A (2006) Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ* 13:31-40.

# **Annex 1:**

---





## Bcl-2 Is a Key Factor for Cardiac Fibroblast Resistance to Programmed Cell Death\*

Received for publication, April 26, 2004, and in revised form, May 28, 2004  
Published, JBC Papers in Press, June 7, 2004, DOI 10.1074/jbc.M404616200

Maritza Mayorga<sup>‡§</sup>, Núria Bahi<sup>‡¶</sup>, Manel Ballester<sup>||</sup>, Joan X. Comella<sup>‡\*\*</sup>,  
and Daniel Sanchis<sup>‡\*\*\*‡§§</sup>

From the <sup>‡</sup>Group of Cell Signaling & Apoptosis, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques and <sup>||</sup>Departament de Medicina, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, 25008 Lleida, Spain and the <sup>¶¶</sup>Laboratori de Recerca, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain

Cardiac fibroblasts play an essential role in the physiology of the heart. These produce extracellular matrix proteins and synthesize angiogenic and cardioprotective factors. Although fibroblasts of cardiac origin are known to be resistant to apoptosis and to remain metabolically active in situations compromising cell survival, the underlying mechanisms are unknown. Here, we report that cardiac fibroblasts were more resistant than dermal or pulmonary fibroblasts to mitochondria-dependent cell death. Cytochrome *c* release was blocked in cardiac fibroblasts but not in dermal fibroblasts treated with staurosporine, etoposide, serum deprivation, or simulated ischemia, precluding caspase-3 activation and DNA fragmentation. Resistance to apoptosis of cardiac fibroblasts correlated with the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2, whereas skin and lung fibroblasts did not express detectable levels of this protein. Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, and Bak were expressed at similar levels in cardiac, dermal, and lung fibroblasts. In addition, the death of cardiac fibroblasts during hypoxia was not associated with the cleavage of Bid but rather with Bcl-2 disappearance, suggesting the requirement of the mitochondrial apoptotic machinery to execute death receptor-induced programmed cell death. Knockdown of *bcl-2* expression by siRNA in cardiac fibroblasts increased their apoptotic response to staurosporine, serum, and glucose deprivation and to simulated ischemia. Moreover, dermal fibroblasts overexpressing Bcl-2 achieved a similar level of resistance to these stimuli as cardiac fibroblasts. Thus, our data demonstrate that Bcl-2 is an important effector of heart fibroblast resistance to apoptosis and highlight a probable mechanism for promoting survival advantage in fibroblasts of cardiac origin.

Programmed cell death (PCD)<sup>1</sup> is involved in heart morphogenesis during embryonic development (1). In the early postnatal period, cardiac myocytes exit the cell cycle and differentiate (2, 3). This implies that in the adult heart newly formed cells cannot replace dead cardiomyocytes although a limited capacity of proliferation has been described (4). The requirement of maintaining heart function in stress situations has selected mechanisms of resistance against stress-induced cell death in this organ. Indeed, an incomplete apoptotic phenotype of cardiomyocytes occurs in heart disease (5, 6). The molecular mechanisms involved in resistance against apoptosis in the heart are now being elucidated. It has been reported that cardiomyocytes are relatively resistant to Fas-induced cell death (7–9). On the other hand, cardiomyocyte mitochondrial dysfunction, comprising mitochondrial potential dissipation, permeability transition, and cytochrome *c* release, occurs in response to several stress stimuli such as postischemic reperfusion (10), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress (11), or hypertrophy (12). However, the exact role that mitochondria play in cardiac apoptosis is still a matter of debate (13). In this regard, we have recently reported that cardiac myocytes are resistant to apoptosis-driven apoptosis by a mechanism involving the silencing of Apaf-1 expression (14).

Despite the relative resistance of cardiac myocytes to caspase-dependent death, it is well established that apoptosis accounts for cardiac cell death during ischemia/reoxygenation (15, 16), hypertension (17), and in maladaptive hypertrophy (18), although necrosis and autophagic cell death also play a relevant role (19). Interestingly, the space left by dead myocytes is filled by granulation tissue composed of several cell types, including macrophages, endothelial cells and fibroblasts (20), and newly synthesized extracellular matrix (ECM) (21, 22), which is produced mainly by cardiac fibroblasts (23). This observation implies that cardiac fibroblasts are able to endure and secrete the ECM that constitutes the fibrotic scar under situations that threaten survival of other cell types. Consistent with the enhanced survival potential of cardiac fibroblasts, it has been reported that these cells have reduced apoptosis and sustained proliferation during hypoxia (24), alcohol exposure (25), and oxidative stress (26, 27). However, the molecular mechanisms underlying the resistance of cardiac fibroblasts to stimuli inducing cell death are presently unknown.

In an attempt to highlight the possible existence of mecha-

\* The present work has been supported by grants from the Fundació Marató de TV3 (to J. X. C. and M. B.) and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/3023 and PI020116, to D. S. and PI020051, to J. X. C.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a Young Researcher Award from the Generalitat de Catalunya (to J. X. C.).

¶ Supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI020116, to D. S.).

\*\* Both authors are co-senior authors.

§§ Supported by a postdoctoral grant from the Generalitat de Catalunya and by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/3023). To whom correspondence should be addressed: Group of Cell Signaling & Apoptosis, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Montserrat Roig, 2 25008 Lleida, Spain. Tel.: 34-973-70-24-14; Fax: 34-973-70-24-38; E-mail: daniel.sanchis@cmb.udl.es.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: PCD, programmed cell death; COXIV, cytochrome *c* oxidase subunit IV; ECM, extracellular matrix; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; MEF, mouse embryonic fibroblast; PFA, paraformaldehyde; siRNA, small interfering RNA; STS, staurosporine; z-VAD-fmk, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone; PBS, phosphate-buffered saline; SD, serum deprivation; RT, reverse transcriptase; SDGD, serum and glucose deprivation.

nisms conferring survival advantage specifically to fibroblasts of cardiac origin, we decided to explore them with several inducers of apoptosis and to compare their response and the expression of several apoptotic regulators with those of primary dermal and pulmonary fibroblasts. Indeed, fibroblasts of cardiac origin were more resistant than dermal- and lung-derived fibroblasts to staurosporine (STS), etoposide, serum deprivation, and simulated ischemia. We further analyzed the intracellular mechanisms involved. Our data pointed to the blockade of cytochrome *c* translocation as the main mechanism of cardiac fibroblast resistance to apoptosis. Furthermore, cardiac fibroblasts expressed an easily detectable level of the anti-apoptotic protein Bcl-2, which is repressed in many cell types after development (28), including dermal (29) and lung (30) fibroblasts. Here, we provide evidence supporting the notion that the maintenance of Bcl-2 expression in cardiac fibroblasts confers their resistance to mitochondria-dependent apoptosis.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Cultures and Treatments**—We obtained neonatal cardiac fibroblasts from the heart of 2–4-day-old Sprague Dawley rats. After digestion of the hearts with type 2 collagenase (Worthington, Lakewood, NJ), cells were pelleted, seeded in 10-cm FALCON polystyrene dishes (BD Biosciences), and incubated for 45 min in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) with 10% fetal calf serum (Invitrogen) and antibiotics. Medium was removed to eliminate cardiomyocytes that did not attach to the non-coated plates, and these were replaced with fresh medium. Cardiac fibroblasts were allowed to grow until confluence was reached, then trypsinized, and passaged twice before use. Skin and lung fibroblasts were obtained by collagenase digestion of dorsal skin patches and lungs from the same pups used to obtain the heart fibroblasts. Dermal and lung fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% fetal calf serum and used after two or three passages. At the time of performing the experiments, all cultures were between 70 and 90% confluent. Etoposide (Sigma) was used at 100  $\mu$ M over 24 h. STS was added to the culture medium at the concentrations and times described in the figures. We added the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (Enzyme System Products, Livermore, CA) at 100  $\mu$ M when indicated. For serum and glucose deprivation, cells were rinsed twice in sterile PBS and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium without glucose and pyruvate (cat. no. D-5070 from Sigma). Simulated ischemia was performed by culturing cells in deprivation medium inside a hypoxic chamber (Billups-Rothenberg) in a mixture of 5% CO<sub>2</sub> and 95% N<sub>2</sub> following the manufacturer's instructions to attain a 0.1% oxygen concentration, and incubated at 37 °C for the time periods indicated in the figures.

**Quantification of Cell Death**—Detection of cell death was performed by the trypan blue exclusion assay at the end of treatment. Data are expressed as percentage of cell death in treated dishes versus equally seeded control dishes at the initiation of the treatments. Apoptosis was quantified as percentage of cells showing condensed or fragmented nuclear morphology versus total nuclei after nuclear staining with bis-benzimide Hoechst H33258 dye (Sigma). Cell death and apoptosis for each experimental condition were measured in duplicate, and error bars represent the S.E. of three independent experiments. DNA fragmentation was assessed by conventional agarose gel electrophoresis as previously reported (14).

**Preparation of Cytosolic Extracts**—Cytosolic fractions were obtained at the end of the treatments by mixing pelleted cells in a buffer without detergent containing 220 mM D-mannitol and 70 mM sucrose (Sigma). Cells were incubated on ice for 25 min and subjected to a serial centrifugation protocol as previously reported (31). Purity of the cytosolic extracts were checked by Western blot detection of lactate dehydrogenase (LDH) as a specific marker of the cytosolic fraction, and cytochrome oxidase subunit IV (COXIV) as a marker for mitochondrial membrane contamination. Images are representative results of three independent experiments.

**Protein Extraction, Western Blotting, and Immunofluorescence**—At the end of the treatments, cells were scraped from the culture dishes, pelleted, and washed with ice-cold PBS. After lysis in 95 °C prewarmed 125 mM Tris, 2% SDS (pH 6.8), cell lysates were centrifuged, and the supernatant was used as whole protein cell lysate. Protein concentration was then measured in total and cytosolic extracts by the Lowry assay. SDS-PAGE electrophoresis was performed, and protein was electrotransferred to Immobilon-P filters (Millipore, Bedford, MA) and re-

acted with relevant primary antibodies. Immunoblots were exposed to appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies and developed with the ECL System (Biological Industries, Israel) or the SuperSignal Substrate (Pierce/Culter). For immunofluorescence detection of cytochrome *c* and activated caspase-3, cells were grown in 4-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), rinsed twice with PBS, and processed as described (14). Finally, cell nuclei were stained with Hoechst for 10 min at room temperature. Cells were rinsed twice with PBS and mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

**Antibodies**—Primary antibodies used in this work were: rabbit polyclonals anti-rat Bcl-x<sub>L</sub> (cat. no. 610211, BD Transduction Laboratories, Palo Alto, CA), anti-caspase-3 (cat. no. AB1899, Chemicon, Temecula, CA) diluted 1:3,000, anti-human-processed caspase-3 (cat. no. 9661, Cell Signaling, Beverly, MA) diluted 1:2,000, anti-human Bak (cat. no. 12-01-16348, Biocarta, Hamburg, Germany) diluted 1:5,000, anti-human Bax (cat. no. 2772, Cell Signaling) diluted 1:5,000, anti-Bim (cat. no. AAP-330, Stressgen Biotech, Victoria, BC, Canada) diluted 1:4,000, anti-human Smac/DIABLO (cat. no. PSC-2409-C100, ProSci Inc.) diluted 1:3,000; goat polyclonal anti-rabbit lactate dehydrogenase (code 100–1173, Rockland, Gilbertsville, PA) diluted 1:5,000; rat monoclonals anti-mouse Apaf-1 (cat. no. ALX-804-349) diluted 1:4,000, anti-mouse Bid (cat. no. MAB860, R&D Systems, Minneapolis, MN) diluted 1:2,000; mouse monoclonals anti-mouse Bcl-2 clone 10C4 (NeoMarkers, Fremont, CA) diluted 1:2,000, anti-COX subunit IV (cat. no. A-21348, Molecular Probes, Eugene, OR) at 1:5,000, anti-rat cytochrome *c* (cat. no. 556432, BD PharMingen) diluted 1:500, anti-pigeon cytochrome *c* (cat. no. 556433, BD PharMingen) at 1:5,000, and anti-human XIAP (cat. no. AAM-050, Stressgen) diluted 1:1,000. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were donkey anti-rabbit (cat. no. NA9340V, Amersham Biosciences) at 1:10,000, rabbit anti-rat (cat. no. 61-9420, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) at 1:5,000, and goat anti-mouse (cat. no. A9917, Sigma-Aldrich) diluted 1:10,000. For immunofluorescence, secondary antibodies were Rhodamine Red-conjugated donkey anti-mouse (code no. 715-295-150, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (cat. no. A-11008, Molecular Probes), both at 1:500.

**Extraction of RNA and RT-PCR of Bcl-2**—Total RNA was purified with the Tri Reagent method (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) from 3 to 4  $\times$  10<sup>6</sup> control cardiac and dermal fibroblasts, following the manufacturer's instructions. Equal amounts of total RNA were retrotranscribed using ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Roche Applied Science). The presence of Bcl-2 transcripts was checked by PCR using the rat Bcl-2-specific primers Bcl2RnFWD 5'-TGCACCTGACGCCCTCAC-3' and Bcl2RnREV 5'-ACACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3', which amplify a fragment of 293 bp. The annealing temperature was 58 °C, and elongation time was 30 s per cycle, in a GeneAmp PCR System 2700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products from cycles 25, 30, and 35 from retrotranscribed samples and control samples, where the RT reaction was omitted, were migrated in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Amplification of ribosomal gene L27 was carried out as the control for cDNA input in the amplification reaction (32).

**Bcl-2 and Bax Transfection**—Human Bcl-2 gene was cloned in pcDNA3 (31). Dermal fibroblasts were transfected by electroporation (Bio-Rad Gene Pulser II) at 240 V and 500 microfarads in 0.5 ml of cold PBS with 1  $\mu$ g of pcDNA3-Bcl-2, or empty vector, plus 0.3  $\mu$ g of pcDNA3-enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) per 10<sup>5</sup> cells. Cardiac fibroblasts were electroporated at 330 V with 1  $\mu$ g of pcI-His-Bax (generously supplied by Jean-Claude Martinou, University of Geneva) or the empty vector, plus 0.3  $\mu$ g of pcDNA3-EYFP. In all the vectors used, expression was driven by the cytomegalovirus promoter. Transfected cultures were treated 48 h later with STS at a final concentration of 0.1  $\mu$ M or serum deprivation, for 24 h. Nuclei were visualized by bis-benzimide staining in 4% PFA-fixed cells, mounted with Vectashield (Vector Laboratories) and visualized with an Olympus IX70 vertical epifluorescence phase-contrast microscope. Apoptosis was counted as the percentage of transfected (green) cells showing chromatin condensation or fragmentation. Data shown are the mean of three independent experiments in duplicate.

**Bcl-2 Gene Silencing**—The following primers were annealed by standard protocols and cloned into pSUPER.retro.puro (Oligoengine Inc., Seattle, WA) previously digested by HindIII and BglII, in order to obtain the rat-specific Bcl-2 small interfering RNA (siRNA) construct (pSRPrBcl-2i): 5'-gatccccGAGTGGGATAACTGGAGATtcaagagaATCTCCAGTATCCCCTctttt-3' and 5'-agctaaaaCGAGTGGGATAC-TGGAGATtctctgaaATCTCCAGTATCCCCTCgggg-3'; or the scram-

bled construct (pSRPrBcl-2scr): 5'-gatccccGAGTATGAATAGCGAAG-GCttcaagagaGCCTTCGCTATTTCATACTCttttt-3', and 5'-agctaaaaa-GAGTATGAATAGCGAAGGCtctcttgaaGCCTTCGCTATTTCATACTC-ggg-3'.

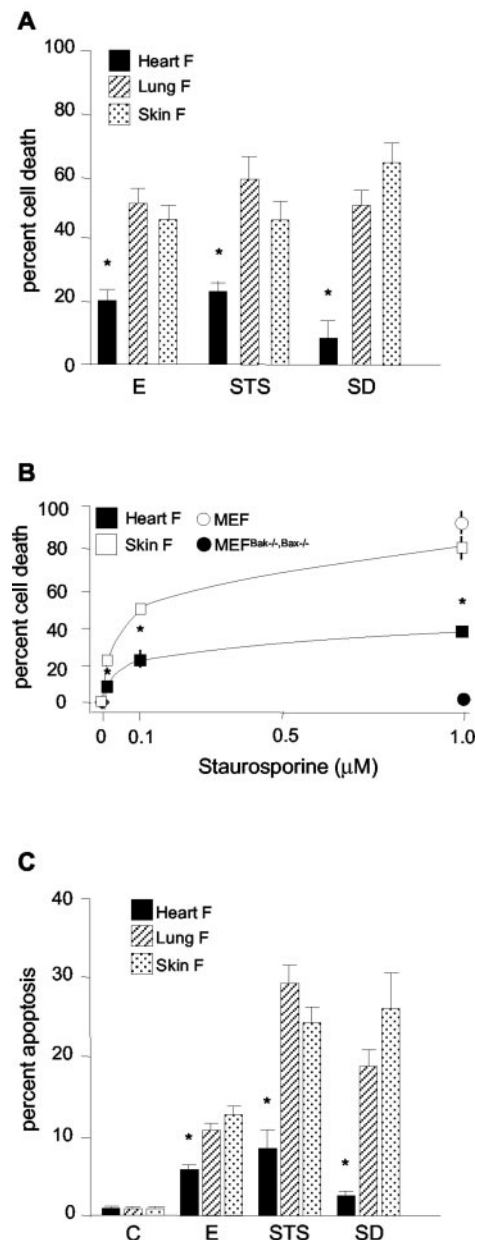
In order to test the efficiency of the siRNA construct in repressing Bcl-2 expression, both constructs were transfected by electroporation into Rat1 rat embryonic fibroblasts (generous gift of Dr. Martín-Zanca). Stable transfected pools of Rat1 cells were obtained by puromycin selection and amplified in presence of the antibiotic. SDS-protein extracts of Bcl-2i-Rat1 and Bcl-2scr-Rat1 cells were tested for the expression of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> by Western blot. Then, 10 μg of pSRPrBcl-2i or pSRPrBcl-2scr were co-transfected with 3 μg of pCDNA-EYFP by electroporation in 10<sup>6</sup> cardiac (330 V) or 10<sup>6</sup> dermal fibroblasts (240 V) at 500 microfarads in a volume of 0.5 ml of ice-cold PBS. Cells were then seeded in six 60-mm culture dishes and cultured in standard medium for 96 h before the initiation of the treatments, as described in the figure legend. Blind counting was adopted to minimize observer bias. Apoptosis was quantified in the cultures by counting green (transfected) cells with fragmented nuclei, visualized by Hoechst staining. Between 300 and 500 green cells were counted for each condition. Data were expressed as percent of green cells with fragmented nuclei *versus* total transfected cells in the culture plate. Experiments were repeated three times with independently isolated, amplified, and transfected primary fibroblasts.

**Statistics**—Student's *t* test was used to compare the difference between the response of cardiac and non-cardiac fibroblasts for every experimental condition, as well as to compare the difference between control group *versus* treatment group in the same type of fibroblasts. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Cardiac but Not Dermal or Pulmonary Fibroblasts Are Resistant to Stimuli Inducing Mitochondria-dependent Programmed Cell Death**—Cell death was measured in primary cardiac, dermal and pulmonary fibroblasts exposed to stimuli known to promote mitochondria-driven PCD: the topoisomerase-II inhibitor etoposide, which induces DNA damage (33); the kinase inhibitor STS (33), and serum deprivation (34). Cell death induced by 24 h of exposure to 100 μM etoposide, 0.1 μM STS, and serum deprivation, was more than 2–3-fold higher in pulmonary and dermal fibroblasts than in cardiac fibroblasts (Fig. 1A). The dose dependence analysis of the effect of exposure to STS for 24 h on fibroblast viability indicated that cardiac fibroblasts were less affected than dermal fibroblasts in a wide range of STS concentrations known to readily kill a number of other cell types (Fig. 1B). Nuclear fragmentation detected by bis-benzimide staining was also 2–3-fold higher in non-cardiac fibroblasts (Fig. 1C). We carried out the same treatments in wild type and Bak/Bax double knockout mouse embryonic fibroblasts (MEF), in parallel experiments. Indeed, cell death was completely blunted in Bak/Bax double knockout MEFs (Fig. 1B and data not shown), confirming that STS, etoposide, and serum deprivation induced cell death mainly by activating mitochondria-dependent apoptosis in fibroblasts, as has been previously reported (33). These results indicate that fibroblasts of cardiac origin were more resistant than skin and lung fibroblasts to apoptotic cell death driven by the mitochondrial pathway.

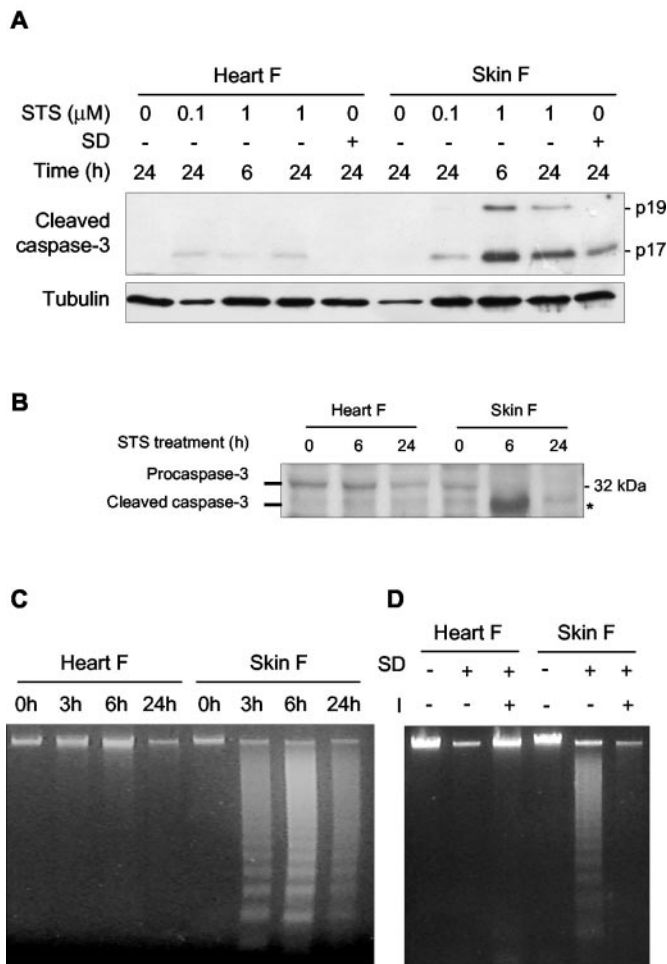
**Cardiac Fibroblasts Do Not Attain Caspase-3 Activation nor DNA Degradation after STS Treatment and Serum Deprivation**—The resistance of cardiac fibroblasts to apoptosis was confirmed by Western blot detection of the activated fragment of caspase-3, p17. STS and serum deprivation did not activate caspase-3 significantly in cardiac fibroblasts (Fig. 2A), but induced the activation of virtually the complete pool of caspase-3 in skin fibroblasts (Fig. 2B). Conventional agarose gel electrophoresis of DNA extracts from cardiac and dermal fibroblasts treated with 1 μM STS or serum deprivation showed the absence of fragmented DNA in cardiac fibroblasts, whereas laddering was obvious in DNA extracts of dermal fibroblasts (Fig. 2, C and D). The role of caspases in DNA damage induced by



**FIG. 1. Cardiac fibroblasts are more resistant than lung and skin fibroblasts to cell death induced by the apoptotic mitochondrial pathway.** A, fibroblast cell death after 24 h of culture in the presence of 100 μM etoposide, 0.1 μM STS or SD. Cell death was measured using the trypan blue exclusion assay and is expressed as percentage of cell death *versus* untreated cultures at time 0. B, dose-dependent effects of STS on cell viability after 24 h of exposure. Cell death in wild type and Bak/Bax double knockout MEFs treated with 1 μM STS are depicted to highlight the relevance of mitochondrial apoptotic pathway in this treatment. C, apoptosis elicited by the same treatments as in A was calculated as percentage of cells showing nuclear condensation or fragmentation. Values are means ± S.E. of three independent experiments in duplicate. Statistically significant differences between treatment groups and their controls (*p* < 0.05), except for Bak/Bax double knockout MEFs and serum-deprived cardiac fibroblasts. \*, *p* < 0.05 *versus* skin and/or pulmonary fibroblasts.

STS and serum deprivation was highlighted by the fact that DNA degradation was inhibited in dermal fibroblasts pretreated with 100 μM pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (Fig. 2D, and data not shown). These results reveal that cardiac fibroblasts can block caspase-dependent apoptosis before entering the execution phase.

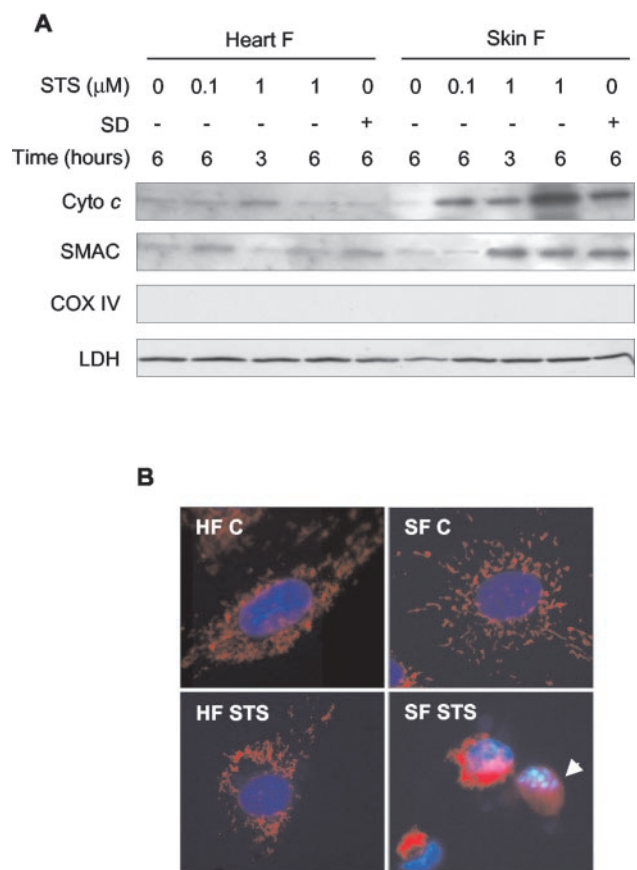
**Apoptotic Mitochondrial Pathway Is Blocked in Cardiac Fibroblasts before Cytochrome *c* Release**—To provide insight into



**FIG. 2. Staurosporine and serum deprivation do not induce activation of executioner caspases nor DNA fragmentation in cardiac fibroblasts.** *A*, activation of caspase-3 was analyzed by immunodetection of the cleaved activated fragment (17/19 kDa) in protein extracts from cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblasts treated with STS or SD. *B*, Western blot of total caspase-3 in whole protein extracts of cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblasts treated with 1  $\mu\text{M}$  STS. The band at  $\approx 32$  kDa corresponds to full-length procaspase-3. Asterisk indicates a product of the cleavage of caspase-3 not corresponding with the length of the active fragment. *C*, DNA low molecular weight fragmentation resolved by 1% agarose-gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining of DNA extracts from cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblasts after treatment with 1  $\mu\text{M}$  STS for the indicated time intervals. *D*, DNA fragmentation induced by 24 h of SD in the presence or absence of 100  $\mu\text{M}$  pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk (*I*). A representative experiment out of three is depicted.

the molecular pathways involved in cardiac fibroblast relative resistance to mitochondria-driven caspase-dependent apoptosis, we analyzed the translocation of cytochrome *c* and Smac/DIABLO in control, STS-treated, and serum-deprived cells. Both treatments induced translocation of cytochrome *c* and Smac/DIABLO to the cytosolic fraction in dermal fibroblasts but not in cardiac fibroblasts (Fig. 3A). The release of pro-apoptotic factors from mitochondria (Fig. 3A) correlated with the activation of caspase-3 (Fig. 2A) and nuclear fragmentation (Fig. 3B). These results suggest that cardiac fibroblast resistance to mitochondria-driven apoptosis occurs upstream of cytochrome *c* release.

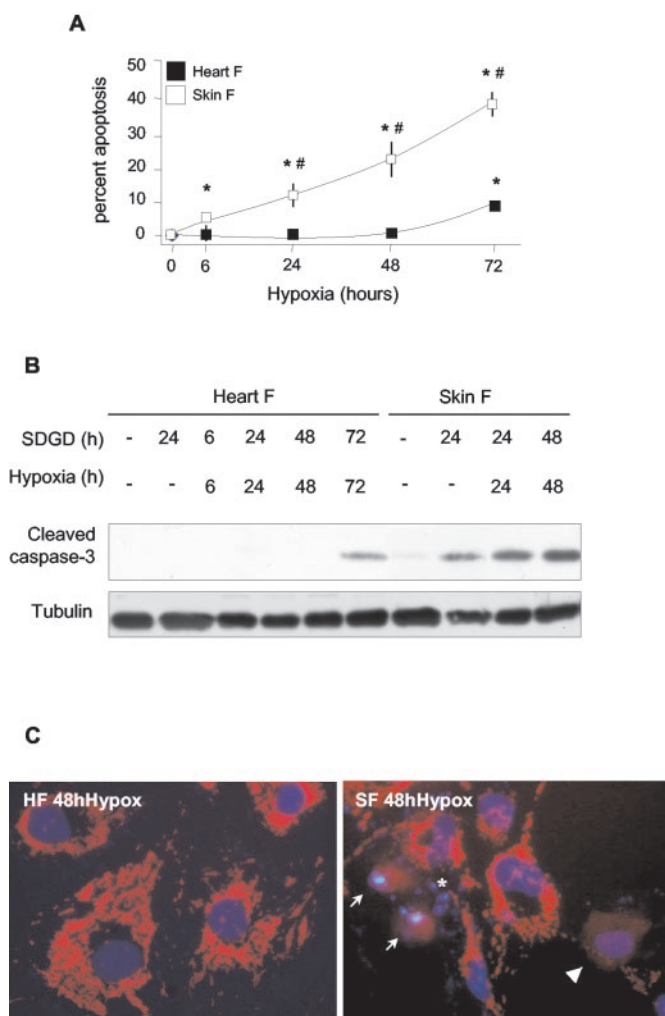
**Cardiac Fibroblasts Are More Resistant than Dermal Fibroblasts to Apoptosis Induced by Simulated Ischemia**—Blood flow interruption leads to a complex pathological situation termed ischemia. In addition to a drop in oxygen tension, which inactivates the respiratory chain and, therefore, impairs the effi-



**FIG. 3. Staurosporine- and serum deprivation-induced programmed cell death is blocked in cardiac fibroblasts before cytochrome *c* translocation.** *A*, immunodetection of cytochrome *c*, Bax, and Smac/DIABLO in the cytosolic fraction of cardiac (*Heart F*) and skin fibroblasts (*Skin F*) treated for 3 and 6 h with 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  STS; or after 6 h of SD. COXIV is a marker of mitochondrial membrane contamination, and LDH is a cytosolic marker. *B*, immunofluorescence detection of cytochrome *c* (red) and nuclear morphology (blue) in control (*C*) heart (*HF*) and dermal (*SF*) fibroblasts and treated with 0.1  $\mu\text{M}$  STS for 24 h. Arrowhead indicates cell with diffuse cytochrome *c* staining and fragmented nuclei. Images show representative results from three independent experiments.

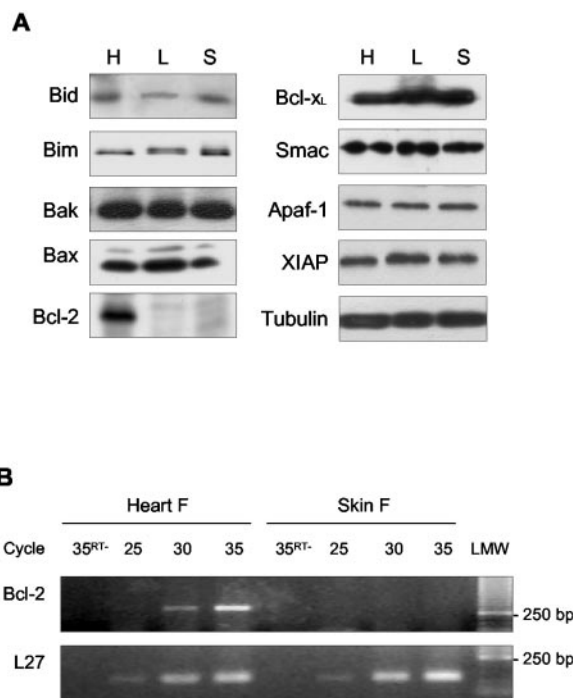
cient production of energy, ischemia also leads to a local deficiency in trophic factors, precursors, and energy-providing metabolites such as glucose. We focused on comparing the response of cardiac and dermal fibroblasts to such an adverse situation because it has been described that cardiac fibroblasts have a certain capacity to overcome heart infarction, at least for a certain time period (35), and die, in part, by apoptosis (36). In our experimental model of serum and glucose deprivation plus hypoxia, dermal fibroblasts readily activated apoptosis (Fig. 4A). Activation of executioner caspases and nuclear fragmentation in dermal fibroblasts was correlated with the depletion of the cytochrome *c* pool (Fig. 4, B and C). Cardiac fibroblasts resisted up to 72 h of simulated ischemia (Fig. 4A), and caspase-3 activation was only detected from 72 h onwards (Fig. 4B). These data suggest that cardiac resistance to ischemia-induced apoptosis involves mechanisms acting upstream of cytochrome *c* release.

**Bcl-2 Is Expressed in Cardiac but Not in Dermal or Pulmonary Fibroblasts**—Bcl-2 family proteins control the integrity of membranes in mitochondria, endoplasmic reticulum, and nucleus and are the major known regulators of apoptotic cytochrome *c* release (37). The inactivation of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>, induces cytochrome *c* release by a mechanism involving pro-apoptotic



**FIG. 4. Cardiac fibroblasts are resistant to PCD induced by simulated ischemia.** *A*, apoptotic cells were counted as described under "Experimental Procedures" in cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblast cultures exposed to serum, glucose, and oxygen deprivation for periods between 6 and 72 h in a hypoxic chamber. Values are mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments in duplicate. \*,  $p < 0.05$  versus controls; #,  $p < 0.05$  versus cardiac fibroblasts at the same time point. *B*, cleaved (activated) caspase-3 was immunodetected in whole protein lysates from cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblasts cultured in deprivation medium (*SDGD*) in normoxia or hypoxia. Representative Western blot is shown from three independent experiments. *C*, cytochrome *c* was detected by immunofluorescence (red), and nuclei were stained with bis-benzimide (blue) in cultures of cardiac (*HF*) and dermal (*SF*) fibroblasts exposed to simulated ischemia during 48 h. Images were captured at  $\times 400$  and are representative of three independent experiments. Arrowhead points to a cell with cytochrome *c* redistribution and intact nucleus. Arrows point to cells with cytochrome *c* redistribution and fragmented chromatin. Asterisks denote cells depleted of cytochrome *c* showing fragmented nuclei.

Bcl-2 family proteins, namely Bax and Bak. Changes in the activity of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins are orchestrated by another subset of pro-apoptotic Bcl-2 family members known as BH3-only proteins (38). Furthermore, by modulating both anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, BH3-only protein Bid is responsible for the activation of cytochrome *c* release upon induction of the death receptor pathway (39). Therefore, we analyzed the expression of Bcl-2-related proteins in total protein extracts from cardiac, pulmonary, and dermal fibroblasts. Detection of Bcl-2-related proteins was undertaken with much attention to the reliability of the antibodies, because several commercially available antibodies against these proteins are not specific (40). Thus, we directly tested antibodies against Bax and Bak on extracts from double knockout MEFs

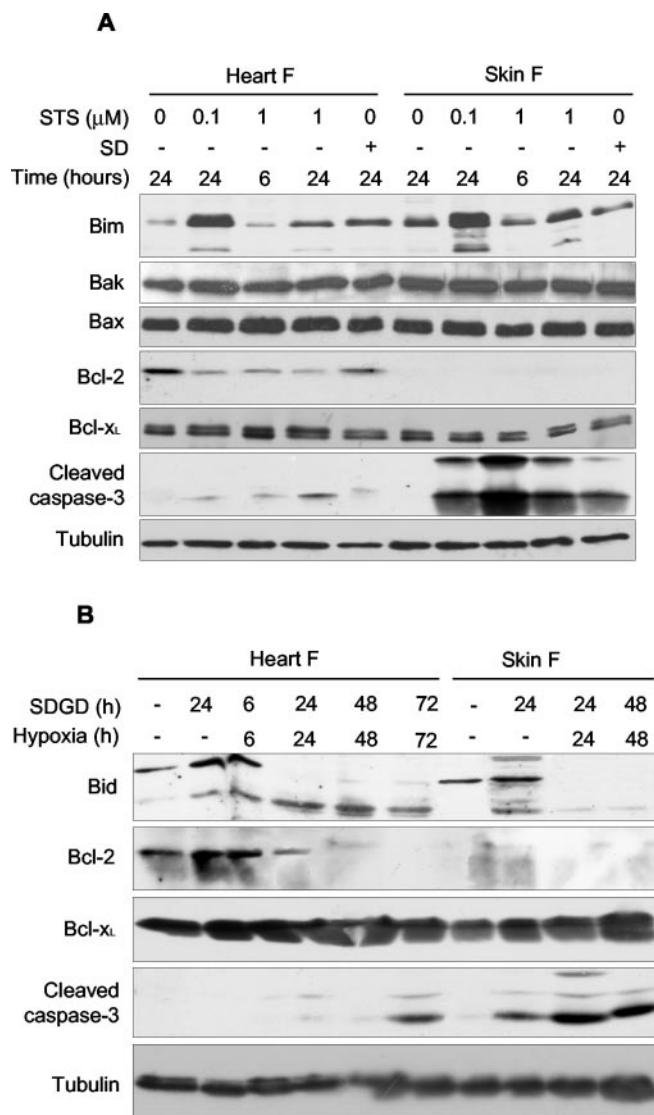


**FIG. 5. Cardiac fibroblasts but not dermal or pulmonary fibroblasts express the anti-apoptotic protein Bcl-2.** *A*, Western blot analysis of Bcl-2 family members and apoptotic regulators was performed in whole protein extracts from control cultures of fibroblasts from heart (*H*), lung (*L*), and skin (*S*). *B*, representative agarose gel image from three independent experiments of Bcl-2 mRNA semi-quantitative RT-PCR amplification from total RNA samples of cardiac and dermal fibroblasts at PCR cycles 25, 30, and 35, as well as from reactions at cycle 35 where the reverse transcription was omitted (35<sup>RT-</sup>). *LMW*, ladder of molecular mass. Ribosomal L27 transcript amplification was used as control of the initial cDNA input.

(data not shown), and we chose antibodies against Bid, Bim, Bcl-x<sub>L</sub>, and Bcl-2 in contrast to the bibliography (40). BH3-only proteins Bid and Bim, pro-apoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak, and anti-apoptotic Bcl-x<sub>L</sub> were expressed at similar levels in cardiac, pulmonary, and dermal fibroblasts (Fig. 5*A*). Pro-apoptotic proteins Smac, XIAP, and Apaf-1, which act downstream of the mitochondrial release of cytochrome *c*, were also expressed in all fibroblast cell types (Fig. 4*A*). Most interestingly, Bcl-2 was undetectable in protein lysates of pulmonary and dermal fibroblasts whereas cardiac fibroblasts expressed easily detectable amounts of this protein (Fig. 5*A*). Fibroblasts were passaged several times before being used. We discarded the possibility of *in vitro*-induced Bcl-2 re-expression in cardiac fibroblasts or Bcl-2 repression in dermal and pulmonary fibroblasts by analyzing Bcl-2 expression in extracts of freshly isolated fibroblasts (data not shown).

In an attempt to determine whether the inhibition of Bcl-2 expression in dermal fibroblasts occurred at the transcriptional or translational level, we carried out Bcl-2 mRNA semi-quantitative determinations. We found no detectable levels of Bcl-2 transcript in total RNA extracts from dermal fibroblasts whereas in cardiac fibroblasts, the Bcl-2 mRNA was amplified from 25 cycles onwards (Fig. 5*B*), suggesting that *bcl-2* expression is regulated in primary fibroblasts at the transcriptional level. Specific expression of Bcl-2 in fibroblasts of cardiac origin suggests that it plays a role mediating the resistance of these cells against apoptosis.

*Resistance of Cardiac Fibroblasts to Apoptosis Correlates with Bcl-2 Expression but Not with Expression or Post-translational Modification of Other Bcl-2-related Proteins*—Bcl-2 expression was maintained in heart fibroblasts during treatment



**FIG. 6. Activation of caspase-dependent apoptosis during hypoxia correlates with disappearance of Bcl-2 rather than with Bid cleavage and Bcl-x<sub>L</sub> expression in cardiac fibroblasts.** *A*, immunodetection of Bcl-2 family proteins in protein extracts of cardiac (*Heart F*) and dermal (*Skin F*) fibroblasts treated for 6 and 24 h with 0.1 and 1.0  $\mu$ M STS or 24 h of SD. A representative image from three independent experiments is depicted. *B*, cardiac and dermal fibroblasts were exposed to 24 h of SDGD or to serum and glucose deprivation plus hypoxia during periods from 6 to 72 h as reported under "Experimental Procedures." Bid, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, and cleaved caspase-3 were immunodetected in total protein lysates. Images are representative of three independent experiments.

with 100 nM and 1  $\mu$ M STS and serum deprivation and was not induced in dermal fibroblasts by either treatment, whereas anti-apoptotic Bcl-x<sub>L</sub> and pro-apoptotic Bak and Bax were expressed at similar levels independent of cell type and treatment (Fig. 6A). BH<sub>3</sub>-only proteins Bid, Bim, and Bad control PCD upstream of the above-mentioned Bcl-2 family members (38). They respond to apoptotic stimuli by increasing their expression and/or by post-translational modification, such as cleavage (Bid) or phosphorylation (Bim, Bad) (38). Enhanced expression and/or phosphorylation of BH<sub>3</sub>-only protein Bim isoforms, which are necessary for apoptosis induction in other cell types such as neurons (40), did not correlate with caspase-3 activation in fibroblasts (Fig. 6A). We did not test Bad expression/phosphorylation because, to our knowledge, there are no reliable and commercially available antibodies detecting endogenous levels of this protein in rat samples (Ref. 40 and

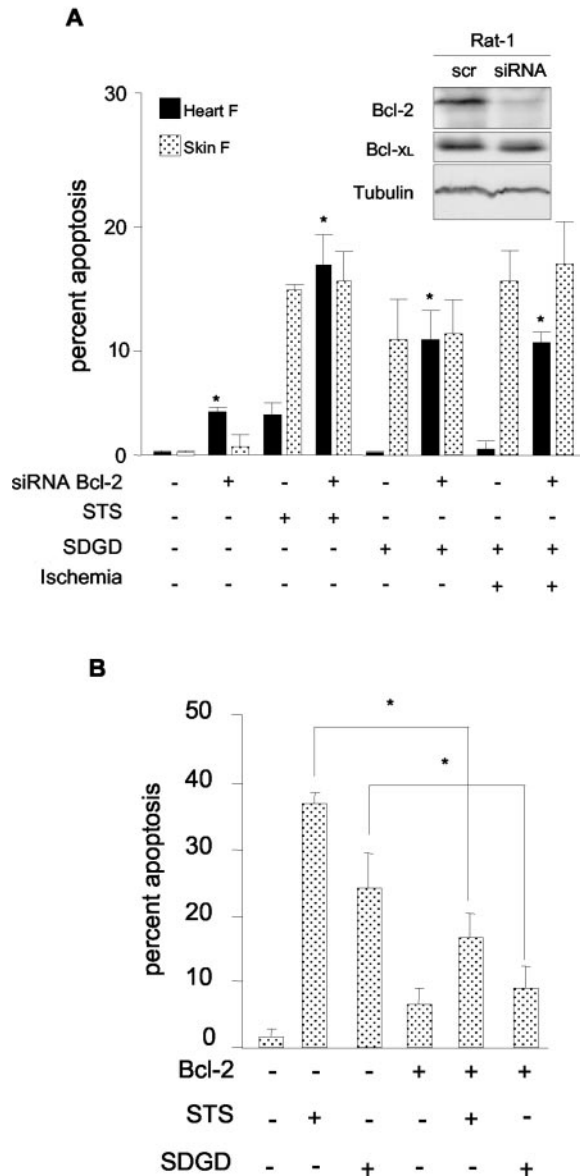
data not shown). In addition, the resistance of cardiac fibroblasts to simulated ischemia-induced PCD lasted while Bcl-2 expression was maintained. Caspase-dependent apoptosis was significant in these cells from 72 h of hypoxia and did not correlate with Bid cleavage but rather with the disappearance of Bcl-2 (Fig. 6B). Altogether, these data demonstrate that, contrary to dermal and pulmonary fibroblasts, cardiac fibroblasts maintain Bcl-2 expression in normal conditions, and that activation of apoptosis correlates with a decrease in Bcl-2 expression rather than with transcriptional or post-translational modifications of other Bcl-2-related proteins.

*Expression of Bcl-2 Is Involved in the Resistance of Cardiac Fibroblasts to Apoptosis*—We further aimed at providing functional evidence for the role of Bcl-2 expression in the resistance of primary cardiac fibroblasts to apoptosis. We obtained a construct allowing Bcl-2 gene silencing using siRNA. A 19-base sequence specific for rat *bcl-2*, (selected from several primers suggested by the siRNA designer, available at the web address: [www.promega.com/siRNADesigner/default.htm](http://www.promega.com/siRNADesigner/default.htm)), was synthesized followed by a short hairpin sequence and the same Bcl-2-specific sequence in reverse order. This primer and its reverse were annealed and cloned into the pSUPER.retro.puro vector allowing selection by puromycin. Primary fibroblasts are transfected at 20–30% efficiency by electroporation. Very few cells remained after a 10-day selection with puromycin and, in addition, did not proliferate. Thus, in order to test the efficacy of the Bcl-2 siRNA construct in repressing Bcl-2 expression, we decided to use the Rat1 rat embryonic fibroblast cell line, as described under "Experimental Procedures" (Fig. 7A, inset). Once the specificity of the siRNA construct in repressing *Bcl-2* but not the *Bcl-x<sub>L</sub>* gene was verified, we performed transient transfection of cardiac and dermal fibroblasts. *Bcl-2* gene silencing induced a higher apoptotic rate in cardiac cells treated with STS, serum, and glucose deprivation or simulated ischemia, whereas it had no effect on dermal fibroblasts, as expected (Fig. 7A). These data confirmed a major role of Bcl-2 in preventing drug-induced and hypoxia-induced apoptosis. Percentages of apoptosis were lower than in experiments done with non-transfected cells. This fact could be explained by a substimulation of apoptotic-transfected cells caused by the loss of green fluorescence preferentially in apoptotic cells.

Confirming the role of Bcl-2 in the resistance of heart fibroblasts to apoptosis, dermal fibroblasts transfected with a vector encoding for Bcl-2 (31) were more resistant to STS treatment and serum and glucose deprivation than cells transfected with empty vector (Fig. 7B). Actually, in Bcl-2-overexpressing dermal fibroblasts apoptosis dropped down to values similar to those observed in STS-treated cardiac fibroblasts, which express Bcl-2 (16.78%  $\pm$  3.01 in dermal fibroblasts expressing Bcl-2 versus 17.40%  $\pm$  2.12 in cardiac fibroblasts;  $n$  = 3). Furthermore, transient transfection of pro-apoptotic Bax in cardiac fibroblasts induced apoptosis despite Bcl-2 expression (5.08%  $\pm$  6.25 versus control, 5.58%  $\pm$  1.73, and STS, 17.40%  $\pm$  2.12;  $n$  = 3). Taken together, the above data suggest that apoptosis occurs through the mitochondrial pathway in primary fibroblasts and point to Bcl-2 as the main factor responsible for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death.

#### DISCUSSION

Cardiac injury resulting from myocardial infarction triggers the so-called cardiac remodeling, a complex phenomenon comprising changes of ventricular size, shape, and thickness (41). Remodeling palliates insufficient heart work, but finally leads to heart failure because of the loss of function of cardiomyocytes and a disproportionate accumulation of ECM, which increases tissue stiffness (42). During heart remodeling, cardiac fibroblasts proliferate and secrete ECM components that will fill up



**FIG. 7. The presence of Bcl-2 dictates the resistance of cardiac fibroblasts to apoptosis induced by STS, serum and glucose deprivation, and simulated ischemia.** *A*, cardiac and dermal fibroblasts were co-transfected with EYFP and a vector allowing the inhibition of *bcl-2* expression (siRNA Bcl-2) or a control vector, as described under "Experimental Procedures." Ninety-six hours later, cells were treated with 0.1  $\mu$ M STS, deprived of serum and glucose (SDGD), or cultured under hypoxia without serum and glucose (Ischemia), for 24 h. Then, cells were PFA-fixed and stained with bis-benzimide. Apoptosis was counted as *green* (transfected) cells with nuclear fragmentation and expressed as percentage of total green cells. Values are means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. *Inset* shows Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> expression in stable transfected pools of the rat fibroblast cell line Rat1 expressing the Bcl2-siRNA vector (siRNA) or the control scrambled vector (*scr*), which were obtained as described above. \*,  $p < 0.05$  versus wild-type cells for each treatment. *B*, transient expression of Bcl-2 induces resistance to STS and SDGD-driven apoptosis in dermal fibroblasts. Fragmented nuclei were counted in Bcl-2 transiently transfected dermal fibroblasts as described under "Experimental Procedures." Treatments were initiated 48 h after transfection. STS was used at a final concentration of 0.1  $\mu$ M for 24 h, and SDGD was maintained for 24 h. Data are expressed as condensed and fragmented nuclei per 100 total nuclei in transfected cells, *i.e.* cells expressing EYFP (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments performed in duplicate; \*,  $p < 0.05$  versus wild-type cells).

the space left by dead myocytes. The increased metabolism of cardiac fibroblasts, during stress situations promoting death of other cell types, underlies the development of resistance mech-

anisms against cell death.

The results presented here provide a likely explanation for the molecular mechanisms underlying the resistance of cardiac fibroblasts to PCD, and therefore at least in part, to cardiac fibroblast cell death. We report that primary cardiac fibroblasts are more resistant than fibroblasts of other origins, *i.e.* dermal and pulmonary fibroblasts, to cell toxicity triggered by stimuli inducing PCD. Treatment with STS, etoposide, serum deprivation, and simulated ischemia induced cell death at a much lower extent in fibroblasts of cardiac origin than in dermal fibroblasts. The high resistance of MEFs deficient for the Bcl-2-related pro-apoptotic proteins Bax and Bak, which are essential for mitochondrial dysfunction and PCD (33), confirmed the relevant role of the cytochrome *c*-dependent pathway in these experimental settings.

The main finding of the present work is that apoptotic cytochrome *c* release is blocked in isolated cardiac but not dermal fibroblasts, pointing to a mechanism of resistance to PCD that does not depend on cell type but on cell origin or level of differentiation. Inhibition of cytochrome *c* release correlated with constitutive expression of Bcl-2 but not of Bcl-x<sub>L</sub> and other Bcl-2 family members, which were equally expressed in all kinds of fibroblasts. We also show that Bid is cleaved in cardiac and dermal fibroblasts during simulated ischemia irrespective of executioner caspase activation. This suggests that mitochondria control the progression of death receptor-dependent PCD in fibroblasts and, by blocking this death pathway, cardiac fibroblasts are protected against a wide range of death stimuli. Furthermore, our data (showing resistance of cardiac fibroblasts up to 3 days from glucose and serum deprivation plus hypoxia) go beyond a previous report describing the lack of DNA degradation after 48 h of hypoxia alone (24). These findings are of pathophysiological relevance because cardiac fibroblasts play an important role in the healing of the ischemic lesion, where the drop in local oxygen tension is accompanied by a restriction in serum and glucose availability.

Originally, overexpression of Bcl-2 was identified as the main cause of lymphoblastic leukemia (43) and was found to provide a survival signal (44). Although the mechanisms by which Bcl-2 induces cell survival are still a matter of debate (37), they include blockade of cytochrome *c* translocation (45). This suggests that expression of Bcl-2 in fibroblasts of cardiac origin is involved in the blockade of cytochrome *c* release and in resistance against toxic stimuli. Maintenance of Bcl-2's constitutive expression in cardiac fibroblasts is interesting because Bcl-2 is down-regulated in most tissues after birth and remains restricted to lymphoid tissue, precursor hematopoietic cells, thymocytes, glandular epithelia, stem cells within the gastrointestinal system, and differentiated long lived cells such as neurons (46). In particular, *bcl-2* is expressed in many cell types of the skin during embryonic life but is repressed after birth in all skin cells but the epithelium (29). Down-regulation of Bcl-2 expression in dermal fibroblasts must involve transcriptional regulation and/or alteration of the Bcl-2 mRNA stability because, as presented here, Bcl-2 transcript was almost undetectable in these cells. In addition, lung-derived fibroblasts also lacked Bcl-2 expression. It is again in accordance with results published by others, showing that pulmonary fibroblasts lose Bcl-2 expression during lung maturation (30). Finally, our data pointing to Bcl-2 as a relevant mediator of cardiac fibroblast resistance to hypoxia are consistent with previous reports where endogenous or induced overexpression of Bcl-2 has been involved in the resistance of other cell types, mainly tumoral cells, to hypoxia (47). Furthermore, overexpression of Bcl-2 in the fibroblast cell line REF52 has been shown to allow E1a-induced proliferation during anoxia by



blocking apoptosis induced by this transcription factor (48).

Here, we also provide experimental evidence in support of a major role of Bcl-2 in the inhibition of cytochrome *c* release and enhanced survival of cardiac fibroblasts. First, inhibition of Bcl-2 expression increased apoptosis in cardiac but not in dermal fibroblasts during STS treatment, serum and glucose deprivation, or simulated ischemia. Second, forced expression of Bcl-2 in dermal fibroblasts conferred resistance to STS-induced and serum- and glucose-induced apoptosis at the same level as in wild-type cardiac fibroblasts. And third, overexpression of pro-apoptotic Bax in cardiac fibroblasts overrode the anti-apoptotic effect of Bcl-2, demonstrating that cardiac fibroblasts are able to complete apoptosis if Bcl-2-controlled steps are bypassed.

Although it is beyond the scope of the present work, it is tempting to speculate about the role of Bcl-2 as cell cycle controller in cardiac fibroblasts. Indeed, Bcl-2 prolongs G<sub>0</sub> phase, thus delaying cell cycle progression by a mechanism involving increased expression of the Cdk-2 inhibitor p27<sup>kip1</sup> and the retinoblastoma family protein p130 (49). This delaying effect of Bcl-2 in cell cycle entry is of relevance because premature entry into S phase under adverse conditions (such as hypoxia) has been associated with apoptosis.

In summary, we provide evidence for the existence of a constitutive anti-apoptotic mechanism acting in cardiac, but not in dermal or pulmonary fibroblasts, which involves the maintenance of Bcl-2 expression and blocks cytochrome *c* translocation, arresting drug-induced and ischemia-induced PCD before the execution phase. This anti-apoptotic mechanism could be involved in the resistance of cardiac fibroblasts to cell death during heart disease, allowing these cells to remain active when other cell types are dying. Altogether, our data unveil Bcl-2 as a key factor regulating cardiac fibroblast survival and, therefore, regulating the role of cardiac fibroblasts in scar formation and heart remodeling.

**Acknowledgments**—We thank Stanley J. Korsmeyer for providing the genetically modified mouse embryonic fibroblasts and Dionisio Martín-Zanca for providing the rat fibroblast cell line Rat1. We also thank Jean-Claude Martinou for the pCl-His-Bax construct.

#### REFERENCES

- van den Hoff, M. J. B., van den Eijnde, S.M., Virágh, S., and Moorman, A. F. M. (2000) *Cardiovasc. Res.* **45**, 603–620
- Kang, M. J., and Koh, G. Y. (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1767–1777
- Flink, I. L., Oana, S., Maitra, N., Bahl, J. J., and Morkin, E. (1998) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 563–578
- Anversa, P., and Nadal-Ginard, B. (2002) *Nature* **415**, 240–243
- Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F.D., Dal Bello, B., Semigran, M. J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G. W., Israels, S., Ballester, M., Virmani, R., Saxena, S., and Kharbanda, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8144–8149
- Scheubel, R. J., Bartling, B., Simm, A., Silber, R. E., Drogaris, K., Darmer, D., and Holtz, J. (2002) *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 481–488
- Nelson, D. P., Setser, E., Hall, D. G., Schwartz, S. M., Hewitt, T., Kleivitsky, R., Osinska, H., Bellgrau, D., Duke, R. C., and Robbins, J. (2000) *J. Clin. Investig.* **105**, 1199–1208
- Badorff, C., Ruetten, H., Mueller, S., Stahmer, M., Gehring, D., Jung, F., Ihling, C., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2002) *J. Clin. Investig.* **109**, 373–381
- Aoyama, D., Takemura, G., Maruyama, R., Kosai, K., Takahashi, T., Koda, M., Hayakawa, K., Kawase, Y., Minatogushi, S., and Fujiwara, H. (2002) *Cardiovasc. Res.* **55**, 787–798
- Di Lisa, F., Menabo, R., Canton, M., Barile, M., and Bernardi, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 2571–2575
- Akao, M., O'Rourke, B., Teshima, Y., Seharaseyon, J., and Marban, E. (2003) *Circ. Res.* **92**, 186–194
- Adams, J. W., Pagel, A. L., Means, C. K., Oksenberg, D., Armstrong, R. C., and Brown, J. H. (2000) *Circ. Res.* **87**, 1180–1187
- Kubasiak, L. A., Hernandez, O. M., Bishopric, N. H., and Webster, K. A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12825–12830
- Sanchis, D., Mayorga, M., Ballester, M., and Comella, J. X. (2003) *Cell Death Differ.* **10**, 977–986
- Olivetti, G., Quaini, F., Sala, R., Lagrasta, C., Corradi, D., Bonacina, E., Gambert, S.R., Cigola, E., and Anversa, P. (1996) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 2005–2016
- Abbate, A., Biondi-Zoccai, G. G., Bussani, R., Dobrina, A., Camilot, D., Feroce, F., Rossiello, R., Baldi, F., Silvestri, F., Biasucci, L. M., and Baldi, A. (2003) *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 753–760
- Gonzalez, A., Lopez, B., Ravassa, S., Querejeta, R., Larman, M., Diez, J., and Fortuno, M. A. (2002) *Hypertension* **39**, 75–80
- Hein, S. H., Arnon, E., Kostin, S., Schönburg, M., Elsässer, A., Polyakova, V., Bauer, E. P., Klövekorn, W.-P., and Schaper, J. (2002) *Circulation* **107**, 984–991
- Kostin, S., Pool, L., Elsasser, A., Hein, S., Drexler, H. C., Arnon, E., Hayakawa, Y., Zimmermann, R., Bauer, E., Klövekorn, W. P., and Schaper, J. (2003) *Circ. Res.* **92**, 715–724
- Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., and Entman, M. L. (2002) *Cardiovasc. Res.* **53**, 31–47
- Schaper, J., and Speiser, B. (1992) *Basic Res. Cardiol.* **87**, Suppl. 1, 303–309
- Agocha, A., Lee, H. W., and Eghali-Webb, R. (1999) *FEBs Lett.* **448**, 206–210
- Eghbali, M., Czaja, M. J., Zeydel, M., Weiner, F. R., Zern, M. A., Seifert, S., and Blumenfeld, O. O. (1998) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**, 267–276
- Long, X., Boluyt, M., Hipolito, M. L., Lundberg, M. S., Zheng, J. S., O'Neill, L., Cirielli, C., Lakatta, E. G., and Crow, M. T. (1997) *J. Clin. Investig.* **99**, 2635–2643
- Chen, D. B., Wang, L., and Wang, P. H. (2000) *Life Sci.* **67**, 1683–1693
- Li, P. F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1999) *FEBs Lett.* **448**, 206–210
- Zhang, X., Azhar, G., Nagano, K., and Wei, J. Y. (2001) *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 2055–2062
- Novack, D. V., and Korsmeyer, S. J. (1994) *Am. J. Pathol.* **145**, 7–10
- Pablos, J. L., Carreira, P. E., Serrano, L., Del Castillo, P., and Gomez-Reino, J. J. (1997) *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 711–719
- Bruce, M. C., Honaker, C. E., and Cross, R. J. (1999) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 228–236
- Yuste, V. J., Sanchez-Lopez, I., Sole, C., Encinas, M., Bayascas, J. R., Boix, J., and Comella, J. X. (2002) *J. Neurochem.* **80**, 126–139
- Soler, R. M., Dolcet, X., Encinas, M., Egea, J., Bayascas, J. R., and Comella, J. X. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 9160–9916
- 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) *Science* **292**, 727–730
- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X., and Williams, R. S. (2000) *Cell* **101**, 389–399
- Virag, J. I., and Murry, C. E. (2003) *Am. J. Pathol.* **163**, 2433–2440
- Takemura, G., Ohno, M., Hayakawa, Y., Misao, J., Kanoh, M., Ohno, A., Uno, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, and T., Fujiwara, H. (1998) *Circ. Res.* **82**, 1130–1138
- Adams, J. M., and Cory, S. (2002) *Nature Rev.* **2**, 647–656
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 1567–1574
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998) *Cell* **94**, 481–490
- Putcha, G. V., Harris, C. A., Moulder, K. L., Easton, R. M., Thompson, C. B., and Johnson, E. M. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 441–453
- Katz, A. M. (2000) *Heart Failure*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Swynghedauw, B. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 215–262
- Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P., and Korsmeyer, S. J. (1988) *EMBO J.* **7**, 123–131
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988) *Nature* **335**, 440–442
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997) *Science* **275**, 1129–1132
- Hockenbery, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M., and Korsmeyer, S. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6961–6965
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1995) *Nature* **374**, 811–813
- Gardner, L. B., Li, F., Yang, X., and Dang, C. V. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9032–9045
- Vario, G., Soos, T. J., Upton, T. M., Zalvide, J., DeCaprio, J. A., Ewen, M. E., Koff, A., and Adams, J. M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4745–4753

## **Annex 2:**

---



# Switch from Caspase-dependent to Caspase-independent Death during Heart Development

## ESSENTIAL ROLE OF ENDONUCLEASE G IN ISCHEMIA-INDUCED DNA PROCESSING OF DIFFERENTIATED CARDIOMYOCYTES<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, February 2, 2006, and in revised form, June 1, 2006. Published, JBC Papers in Press, June 5, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601025200

Núria Bahi<sup>1</sup>, Jisheng Zhang<sup>2</sup>, Marta Llovera<sup>3</sup>, Manel Ballester, Joan X. Comella<sup>4</sup>, and Daniel Sanchis<sup>4,5</sup>

From the Laboratori d'Investigació, Hospital Arnau de Vilanova, Department of Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Av. Rovira Roure, 80.25198 Lleida, Spain

Differentiated cardiomyocytes are resistant to caspase-dependent cell death; however, the mechanisms involved are still uncertain. We previously reported that low Apaf1 expression partially accounts for cardiomyocyte resistance to apoptosis. Here, we extend the knowledge on the molecular basis of cardiac resistance to caspase activation by showing that the whole caspase-dependent pathway is silenced during heart development. Experimental ischemia triggers caspase activation in embryonic cardiomyocytes and proliferating fibroblasts, but not in neonatal and adult cardiomyocytes. Ischemia induces the release of the proapoptotic factors cytochrome *c*, truncated-AIF, and EndoG from mitochondria in postnatal cardiomyocytes in the absence of caspase activation. On the one hand, lentiviral-driven knockdown of EndoG shows that this gene is essential for ischemia-induced DNA degradation in neonatal cardiomyocytes, but not in proliferating fibroblasts; on the other hand, the AIF gene is essential for high molecular DNA cleavage in fibroblasts, but not in postmitotic cardiomyocytes, where it plays a prosurvival role during reoxygenation. These results show the switch from caspase-dependent to caspase-independent death pathways after cardiac cell differentiation, and disclose the relevance of EndoG in the caspase-independent DNA processing of differentiated cardiomyocytes.

Apoptosis, the best characterized type of programmed cell death (PCD),<sup>6</sup> is executed by a family of cysteinyl aspartate pro-

teinases known as caspases (1). Activation of caspases, either by extrinsic or intrinsic signals, is regulated by a set of proteins, including the components of the death-inducing signaling complex (DISC), in the death receptor-mediated extrinsic pathway, and the Bcl-2 family of anti- and proapoptotic proteins, as well as the apoptosome complex including Apaf-1, in the intrinsic pathway, which involves the mitochondrion (2). The apoptotic process ends with the degradation of nuclear DNA by the caspase-dependent endonuclease CAD/DFF40 (3).

Although the order in which every step of caspase-dependent PCD takes place is well defined in proliferating and undifferentiated cells, the precise cell death pathways activated in differentiated cardiomyocytes and neurons remain more elusive (4–6). In cardiomyocytes, the prevailing dogma that the caspase-dependent machinery is fully functional has been recently challenged (4, 7). In addition, although cardiac apoptotic rates of 0.1–0.01% occurring during cardiac disease have been estimated to be pathologically relevant (8, 9), the underlying mechanisms for the low incidence of apoptosis have not been addressed. Nevertheless, apoptotic cells have been detected in the heart and in cardiomyocyte cultures during ischemia (10–13). Therefore, cardiac ischemia is a clinically relevant model for analyzing the mechanisms that promote death in differentiated cardiomyocytes.

Potential executors of caspase-independent cell death have been discovered. The mitochondrial protein apoptosis-inducing factor (AIF) was identified as an important executor of cell death when translocated to the nucleus (14). Translocation of AIF has been proposed to be both caspase-dependent (15, 16) and caspase-independent (17–19), although the reason for this discrepancy is uncertain (20). Furthermore, the death-inducing role of AIF in differentiated cells is controversial. Indeed, the participation of AIF in cell death has been either confirmed (19, 21–23) or discarded (24, 25). Thus, the role of AIF in promoting cell death and the mechanisms involved in promoting its release from mitochondria need to be better characterized.

In the nematode *Caenorhabditis elegans*, AIF is a component of the caspase-dependent mitochondrial pathway, which also involves the mitochondrial endonuclease EndoG (26). However, the role of EndoG in apoptotic DNA damage was initially suggested to be caspase-independent (27, 28). Furthermore,

quinoline; DIQ, 1,5-dihydroxyisoquinoline; EndoG, endonuclease G; PARP, poly-ADP-ribose polymerase; Z, benzyloxycarbonyl; fmk, fluoromethylketone; TNF, tumor necrosis factor; shRNAi, small hairpin RNA interference.

\* This work was supported in part by a Grant from the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant PI020106, to D. S.), a Grant from the Sociedad Española de Cardiología (to D. S.), a Grant from La Marató de TV3 (to J. X. C.), and Suport als Grups de Recerca from the Government of Catalonia. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table S1 and Figs. S1–S3.

<sup>1</sup> Recipient of a predoctoral fellowship from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (Government of Catalonia).

<sup>2</sup> A predoctoral fellow supported by FIS Grant PI020106 (to D. S.).

<sup>3</sup> Ramón y Cajal fellow of the Spanish Ministry of Education and Science.

<sup>4</sup> Both authors are co-senior authors.

<sup>5</sup> Ramón y Cajal fellow of the Spanish Ministry of Education and Science. To whom correspondence should be addressed: Cell Signaling & Apoptosis Group, Laboratori d'Investigació HUAV- Dept. CMB UdL. Av. Rovira Roure, 80 25198 Lleida, Spain. Tel.: 34-973-70-22-15; Fax: 34-973-70-22-13; E-mail: daniel.sanchis@cmb.udl.es.

<sup>6</sup> The abbreviations used are: PCD, programmed cell death; AIF, apoptosis-inducing factor; DPQ, 3,4-dihydro-5[4-(1-piperindinyl)butoxy]-1(2H)-iso-

## EndoG Executes Ischemia-induced Cardiac DNA Processing

recent data from EndoG deficient mice do not apparently support a relevant role of this protein in mammalian cell death and DNA processing (29, 30). Therefore, the role of EndoG in mammalian cell death and the mechanisms involved in its release from mitochondria deserve further investigation.

While studying the mechanisms involved in cardiomyocyte cell death, we found that these cells down-regulate the expression of caspases after birth. Therefore, we checked the role of several known caspase-independent effectors of cell damage by using a lentiviral-driven gene knockdown approach. Results herein reported prove that cardiomyocytes lose the competence to die by apoptosis after the caspase-dependent machinery is silenced during development, and show the existence of a caspase-independent, yet mitochondria-dependent, cell death pathway involving translocation and activation of EndoG, leading to the degradation of nuclear DNA, independently of AIF.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals**—Executor caspase-specific substrate Z-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (Z-DEVD-AFC), caspase-8-specific substrate Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (Z-IETD-AFC), pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH<sub>2</sub>F (z-VAD-fmk), poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors 3,4-dihydro-5[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinoline (DPQ) and 1,5-dihydroxyisoquinoline (DIQ), and calpain inhibitor carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal (MDL 28170) were purchased from Calbiochem. Other chemicals were purchased from Sigma unless otherwise stated.

**Cell Culture, Treatments, and Viability Measurements**—Rat neonatal cardiomyocytes and heart fibroblasts were obtained from the heart of 3–5-day-old Sprague-Dawley rats as described elsewhere (4, 31). Embryonic cardiomyocytes (E16) were obtained following essentially the same protocol, but reducing the time of digestion to 15 min, and were cultured in the same medium enriched with 1  $\mu$ M insulin (Sigma), 1 ng/ml cardiotrophin-1 (R&D Systems), and 10 nM mouse epidermal growth factor (Upstate). Adult cardiomyocytes (P180) were obtained and cultured following the protocol described by Ravassa *et al.* (32). Experimental ischemia was achieved by culturing cells in Tyrode's solution (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, and 0.5 mM, initial pH: 7.2) inside a hypoxic chamber (Billups-Rothenberg) in a mixture of 5% CO<sub>2</sub> and 95% N<sub>2</sub> following manufacturer's instructions to attain a 0.1% oxygen concentration (31). Quantification of cell death was performed by the trypan blue exclusion assay at the end of treatments as reported (31). Cell death in each experimental condition was measured in duplicates, and error bars represent the S.E. of three independent experiments.

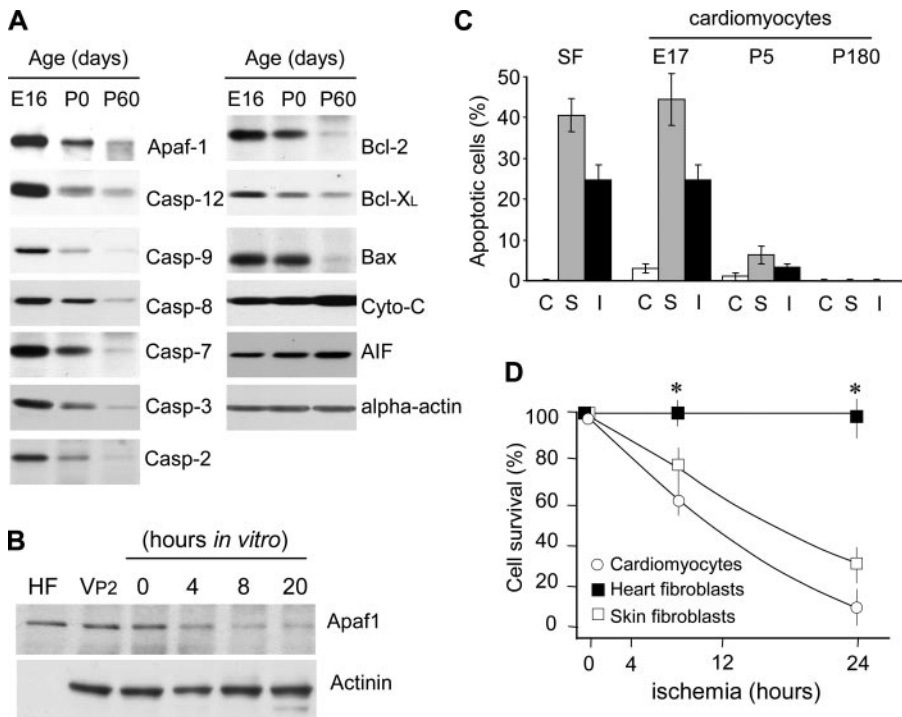
**Enzymatic Caspase Activity Assay**—Caspase-8 (Z-IETD-AFC) and executioner (Z-DEVD-AFC) caspase activity were measured in cell extracts as previously reported (4), using the fluorogenic substrates at 50  $\mu$ M in 96-well plates. Fluorescence was detected with a Bio-tek FL 600 fluorometer (Izasa). Data obtained for different experimental conditions were compared within the linear phase of absorbance increase. Data are the mean of three independent experiments performed in duplicates.

**Cytosolic Extracts**—Cytosolic fractions were obtained as previously reported (4) at the end of the treatments to detect the release of apoptotic factors from the mitochondria.

**Western Blot and Immunofluorescence Detection**—Whole cell lysates were obtained by addition of Tris-2%SDS pH: 6.8 buffered solution to the cell cultures at the end of the treatments. Protein extracts were denatured by heat shock at 95 °C for 3 min and quantified by the Lowry Assay (Bio-Rad). Equal amounts of protein were electrophoresed by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Biosciences), and probed with specific antibodies (supplemental Table S1). For immunofluorescence detection, cells were cultured in 4-well plates (NunClon) and fixed by either incubation with paraformaldehyde 4% for 10 min or by 100% methanol for 5 min. Cells were rinsed, permeabilized, and stained as described previously (31). For apoptosis quantification, cells showing cleaved caspase-3 expression and nuclear fragmentation were counted as apoptotic. At least, 100 cells were analyzed per condition and values are mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

**DNA Integrity Assay**—Cells were pelleted at the end of each treatment and frozen at  $-80$  °C. Pellets from the same experiment were processed at once. They were diluted in 40  $\mu$ l of sterile phosphate-buffered saline, mixed with 40  $\mu$ l of melted 1% low melting agarose (Sigma) in 0.5 $\times$  TBE (45 mM Tris pH 8.3, 45 mM boric acid, 1.0 mM EDTA). Each mixture was poured into a block caster and let to solidify. Each agarose block was submerged into 1 ml of lysis buffer (1% lauryl sarcosil, 0.5 M EDTA, 10 mM Tris, pH 8, 100  $\mu$ g/ml proteinase K) at 50 °C during 24 h in mild agitation, and rinsed twice with 0.5 $\times$  TBE for 1 h at room temperature. For analysis of DNA high molecular weight degradation, the blocks were then laid into wells of a 1% agarose, 0.5 $\times$  TBE gel (CHEF grade, Sigma). Pulse field electrophoresis was performed in a CHEF DR-II system (Bio-Rad) set to the following protocol: run time, 14 h; switch time from 5 to 50 s; voltage gradient, 6 V/cm. Initial lysis buffer was further processed to analyze DNA low molecular weight degradation. Briefly, 1 ml of lysis buffer from DNA extraction was mixed with 1 ml of ethanol, kept at  $-20$  °C for 18 h, and centrifuged. The pellet was rinsed with 70% ethanol, centrifuged again, and the final DNA pellet was diluted in 20  $\mu$ l of 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, and 10  $\mu$ g/ml RNase. Conventional 2% agarose-gel electrophoresis was performed. Gels were stained with SYBR Safe (Molecular Probes), visualized by UV exposure and recorded with a Kodak DC290 digital camera.

**Overexpression and Detection of FLAG-tagged EndoG in Cardiomyocytes**—To test the hypothesis that EndoG translocates from mitochondria to cytosol during ischemia in cardiomyocytes, the coding sequence of EndoG contained in the mouse IMAGE clone 5029633 (MRC Gene Service) was PCR-amplified flanked by the EcoRI and XbaI sites and was subcloned into the pCDNA3.1 expression plasmid (Invitrogen) in-frame and upstream to a FLAG tag. Cardiomyocytes were transfected by the Lipofectamine system (Invitrogen) and overexpressed EndoG-FLAG was detected by immunofluorescence and Western blot with an anti-FLAG antibody (Sigma).



**FIGURE 1. Silencing of caspase expression during cardiomyocyte differentiation *in vivo* and *in vitro* correlates with a reduction in ischemia-induced caspase activation.** *A*, expression of caspases, cytochrome *c*, Bcl-2-related proteins, and Apaf-1 was detected in SDS extracts of ventricles from embryonic day 16 (E16), neonatal (P0), and 60-day-old rats (P180). *B*, Apaf-1 protein expression in protein extracts of cardiac fibroblasts (HF), ventricle of a 2-day-old rat (VP2), and isolated cardiomyocytes from 3-day-old pups, at 0–20 h *in vitro*. *C*, cells expressing cleaved caspase-3 and presenting fragmented nucleus were counted as apoptotic in cultures of skin fibroblasts, and embryonic, neonatal and adult cardiomyocytes. *C*, control; *S*, staurosporine 1  $\mu\text{M}$  16 h; *I*, ischemia 16 h. Skin fibroblasts (SF) were used as positive control. *D*, cell viability during ischemia in postnatal cardiomyocytes, cardiac, and dermal fibroblasts. Values are percentage of living cells *versus* cells in plates counted at time 0. \*,  $p < 0.01$  *versus* cardiomyocytes and skin fibroblasts. Data are means  $\pm$  S.E. of three independent experiments made in triplicates.

**Gene Knockdown by Small Hairpin RNA Interference (shRNAi) using Lentiviral Vectors**—Specific 19 nucleotide sequences were chosen for each gene (AIF, EndoG) using the free RNAi design interfaces available at the Promega and Invitrogen web sites. Primer couples were designed for cloning in the pSUPER plasmid (Oligoengine) using the BglII and HindIII sites. Primers were designed against the sequences 5'-GGCAACATGGTGA-AACTTA-3' for rat AIF and 5'-GGAACAACCTTGAGAA-GTA-3' for rat EndoG. Then, an EcoRI/ClaI fragment containing the H1 promoter for the RNA polymerase III and the shRNAi sequence was cut from pSUPER and subcloned into the pLVTHM plasmid (from Dr. Trono, Geneva). For each gene, we designed a couple of primers carrying two nucleotide changes from the original sequence that were initially used to verify the specificity of the shRNAi constructs. Each specific shRNAi vector was transfected into HEK293T cells together with the plasmids psPAX2 and pMD2G (from Dr. Trono), using the polyethyleneimine transfection method (Sigma). Transfection efficiency was analyzed by detection of the enhanced green fluorescence protein (EGFP) expression, whose coding sequence is contained in the pLVTHM plasmid and driven by an IRES sequence. The 293T medium was collected after 48 h of transfection and centrifuged at  $50,000 \times g$  for 3 h. The final viral pellet was diluted in sterile phosphate-buffered saline plus 2% bovine serum albumin and titrated by transduction of cardiac fibroblasts before treating cardiomyocytes. Cardiomyocytes

were transduced 4 h after seeding. Efficiency of transduction was estimated to be over 80% by detection of EGFP expression at 48 h. The capability of the constructs for repressing each gene was routinely tested by Western blot for AIF and by RT-PCR from total RNA for EndoG, as described below. The maximum efficacy of the shRNAi plasmids for reducing endogenous expression of the genes was determined to reach a plateau from 4–6 days after transduction, depending on the gene. Therefore, treatment of cardiomyocytes was started always 6 days after transduction, *i.e.* after seeding. All experiments carried out with transduced cardiomyocytes were repeated at least four times.

**Detection of EndoG Transcript by RNA Reverse Transcription Coupled to Standard PCR**—Gene expression was analyzed by reverse transcription coupled to PCR (RT-PCR) from total RNA extracts as reported for other genes (31). Conventional PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2700 thermocycler (Applied Biosystems), using an annealing temperature of 55  $^{\circ}\text{C}$ , with the primers forward: 5'-GACTTCCAC-

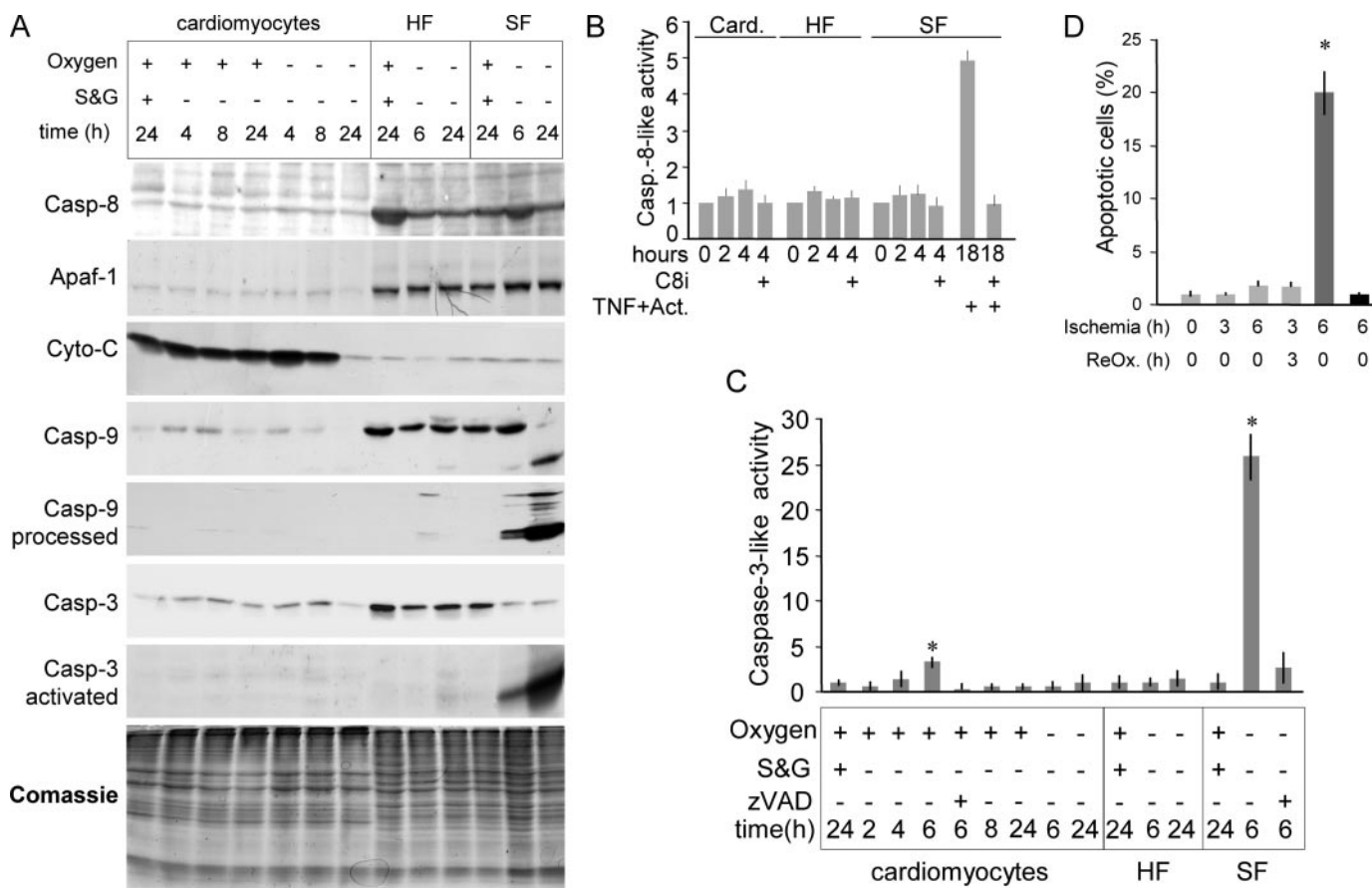
GAGGACGATTC-3', and reverse: 5'-AAGCTGCGGCTGTACTTCTC-3', producing an amplicon of 218 bp. Control for cDNA input in the amplification reaction performed with a couple of primers amplifying a fragment of the "upstream of n-Ras" (unr) gene. PCR products were migrated in 2% agarose gels and visualized by SYBR Safe staining.

**Statistical Analysis**—Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments. The significance of differences among means was evaluated using the Student's *t* test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**Down-regulation of the Caspase-dependent Death Pathway during Cardiac Development Is Associated with a Decrease in Ischemia-induced Caspase Activation in Cardiomyocytes**—Expression of the main regulators of caspase-dependent cell death decreased with age in the rat myocardium (Fig. 1A). Apoptotic gene repression took place also *in vitro* in postnatal cardiomyocytes (Fig. 1B). Experimental ischemia (ischemia, hereafter) was achieved by culturing cells inside a hypoxic chamber (31) in a Tyrode's solution without serum and glucose that becomes acidic during hypoxia (final pH 6.1–6.4). We used skin fibroblasts as positive control for the activation of caspases in this setting (31). Executioner caspase-3 activation was observed in embryonic cardiomyocytes and skin fibroblasts, but not in postnatal and adult cardiomyocytes during ischemia or stauro-

## EndoG Executes Ischemia-induced Cardiac DNA Processing



**FIGURE 2. Lack of caspase re-expression in ischemic cardiomyocytes and relevance of the mitochondrial pathway in ischemia-induced fibroblast apoptosis.** *A*, detection of caspases, their cleaved (active) products, and some regulators of apoptosis, in total protein extracts of postnatal day 5 cardiomyocytes, cardiac (*HF*), and skin fibroblasts (*SF*), cultured in presence or absence of serum and glucose (*S&G*) and oxygen. *B*, initiator caspase-8 activity in extracts of ischemic cardiomyocytes (*Card.*), cardiac (*HF*), and dermal fibroblasts (*SF*), in the presence or absence of a caspase-8 inhibitor (*C8i*). Skin fibroblasts treated with  $TNF-\alpha$  + actinomycin were used as positive control. *C*, executioner caspase activity measured in extracts of serum and glucose-deprived (*S&G*), or serum-, glucose-, and oxygen-deprived (ischemic) postnatal cardiomyocytes, heart fibroblasts (*HF*), and skin fibroblasts (*SF*). *zVAD*, pan-caspase inhibitor *zVAD.fmk*  $100 \mu M$ ; \*,  $p < 0.01$  versus control. Caspase activities are expressed as fold increase versus control value. *D*, adult cardiomyocytes (gray bars), embryonic cardiomyocytes (dark gray bar), and heart fibroblasts (black bar) expressing processed caspase-3 were counted as apoptotic, at several time points during ischemia and reoxygenation. Data are apoptotic cells versus total cells in each well and means were calculated from 4 wells per treatment. \*,  $p < 0.01$  versus adult cardiomyocytes.

sporine treatment (Fig. 1C and supplemental Figs. S1–S3). However, ischemia induced cell death to a similar extent in postnatal cardiomyocytes and skin fibroblasts, whereas cardiac fibroblasts survived to the ischemic period (Fig. 1D). On this account, we have previously reported that cardiac fibroblasts are resistant to apoptosis because of their strong expression of the antiapoptotic factor Bcl-2 (31). These data establish a correlation between the silencing of the apoptotic genes during myocardial development and the reduction in the competence of postnatal cardiomyocytes to activate apoptosis.

**Lack of Caspase Re-expression and Caspase Activity in Cardiomyocytes during Ischemia and Relevance of the Mitochondrial Pathway in Ischemia-induced Fibroblast Apoptosis**—Expression of the initiator caspases-8 and -9, the postmitochondrial regulator Apaf-1, and the executioner caspase-3, were significantly less expressed in cultured postnatal cardiomyocytes than in cardiac and dermal fibroblasts (Fig. 2A). Importantly, myocardial expression of these genes was not up-regulated during ischemia (Fig. 2A). Processing of caspase-9, an initiator caspase in the mitochondrial pathway, occurred in skin fibroblasts and, later in cardiac fibroblasts, but not in cardiomyocytes (Fig. 2A). Ini-

tiator caspase-8-like activity was measured as an indication of the role of the death receptor-dependent pathway during ischemic cell death. Caspase-8 activity was not detected in ischemic cardiomyocytes, cardiac, and dermal fibroblasts before caspase-3 was engaged (Fig. 2B). Executioner caspase activity was not detected in ischemic cardiomyocytes but was evident in skin fibroblasts (Fig. 2C). These results suggest that a low expression of the caspase-dependent machinery in postnatal cardiomyocytes is maintained during ischemia, thus limiting the impact of caspase activation. Furthermore, executioner caspase processing was not substantially enhanced when ischemic adult cardiomyocyte cultures (pH 6.1–6.4) were reoxygenated and cultured in standard medium (pH 7–7.5) (Fig. 2D). However, ischemia activated the mitochondrial pathway of apoptosis in proliferating cell types such as fibroblasts (Fig. 2A).

**The Pattern of DNA Degradation Induced during Ischemia in Cardiomyocytes Suggests the Participation of Caspase-independent Mechanisms**—Caspase-dependent cell death induces a characteristic pattern of DNA degradation related to the activity of endonucleases that cleave DNA between nucleosomes, rendering fragments of low molecular weight, the so-called

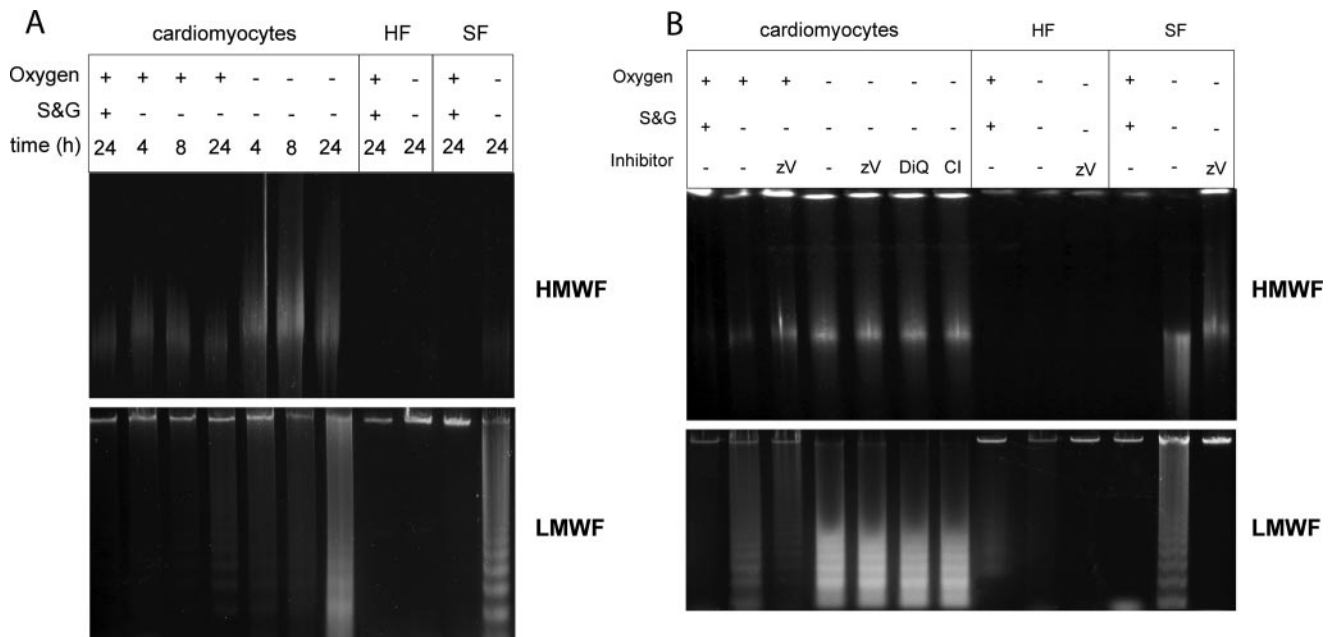


FIGURE 3. **Ischemia induces caspase-independent DNA fragmentation in postnatal cardiomyocytes.** Simultaneous analysis of high and low molecular weight fragmentation (HMWF and LMWF) in DNA obtained from cardiomyocytes, heart-derived (HF), and skin (SF) fibroblasts. *A*, time course of DNA degradation in cultures exposed to the presence or absence of oxygen and/or serum and glucose (S&G). *B*, DNA fragmentation at 18 h of serum and glucose (S&G) deprivation or ischemia in cardiomyocytes, cardiac (HF) and skin (SF) fibroblasts, with or without 100  $\mu$ M pan-caspase inhibitor z-VAD.fmk (zV), 30  $\mu$ M PARP-1 inhibitor DIQ, or 100  $\mu$ M calpain inhibitor MDL 28170 (CI). Results in this figure are representative of three independent experiments.

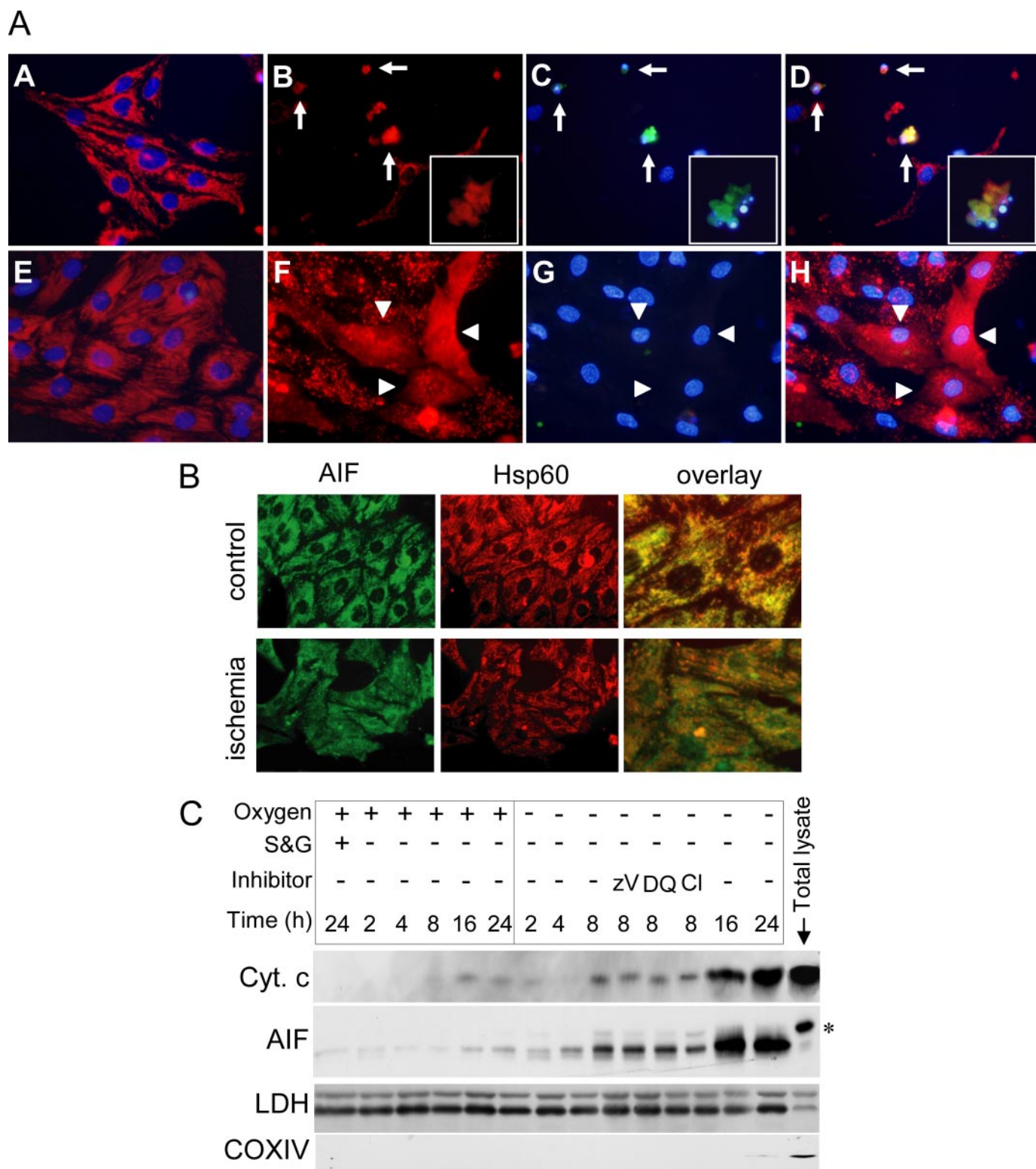
DNA laddering. Caspase-independent PCD can induce high molecular weight fragmentation of DNA, mainly in fragments of  $\sim$ 50 kb (14), and/or low molecular weight fragmentation, which appears as a smear after electrophoresis, because of the ability of the caspase-independent DNAses, such as EndoG, to cleave inside the nucleosomes (33). In aerobic conditions, serum and glucose deprivation for 20 h induced two types of DNA degradation in cardiomyocytes. A faint DNA low molecular weight laddering (Fig. 3A, lower panel) that was partially reverted by the pan-caspase inhibitor z-VAD.fmk (Fig. 3B, lower panel), and high molecular weight fragmentation (Fig. 3A, upper panel), which was not blocked by z-VAD.fmk (Fig. 3B, upper panel). During ischemia, *i.e.* serum and glucose deprivation in hypoxia and acidosis, cardiomyocyte DNA was fragmented rendering a low molecular weight smear in agarose gels. Upon ischemia, DNA smear was not inhibited by the caspase inhibitor z-VAD.fmk. PARP-1 has been involved in ischemia-induced neuronal cell death (34); however, ischemia-induced cardiac DNA damage was not blocked by the two PARP inhibitors DIQ and DPQ. In addition, although calpains have been shown to trigger the release of AIF *in vitro* (35), addition of the pan-calpain inhibitor MDL 28170 did not prevent DNA high molecular weight degradation in ischemic cardiomyocytes (Fig. 3, A and B). Furthermore, high molecular weight fragmentation of DNA, compatible with the activity of caspase-independent pathways, was rapidly activated within a few hours of ischemia (Fig. 3A, upper panel), and was not inhibited neither by z-VAD.fmk, nor by DIQ. In contrast, DNA degradation was not observed in ischemic heart fibroblasts after 24 h of treatment, in agreement with our previous results (31). Ischemic skin fibroblasts showed a canonical pattern of DNA low molecular weight degradation, which was completely abol-

ished by z-VAD.fmk (Fig. 3, A and B). Therefore, the pattern of DNA degradation during cardiomyocyte ischemia and its execution in the presence of caspase inhibitors suggest the predominant role of a caspase-independent mechanism of cell death.

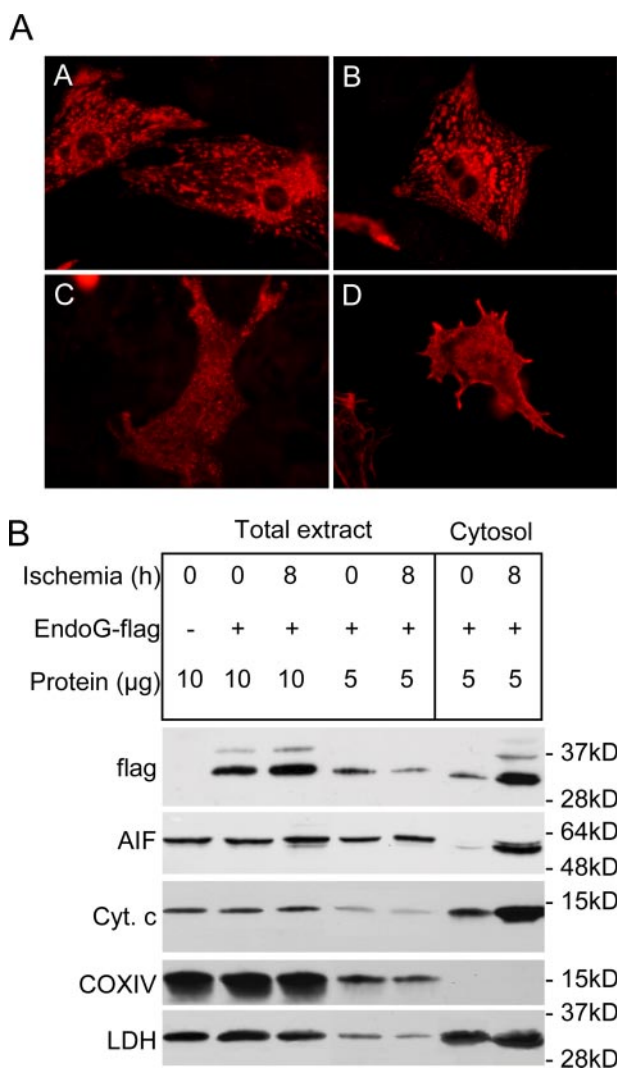
*Ischemia Induces Cytochrome c, Truncated AIF, and EndoG Release from Cardiac Mitochondria in the Absence of Caspase Activation*—We have previously reported that staurosporine does not induce caspase activation in cardiomyocytes despite cytochrome *c* translocation, and that overexpression of Apaf-1 partially antagonizes this resistance (4). Therefore, we analyzed the release of proapoptotic mitochondrial factors during ischemia in cardiomyocytes. Cytochrome *c* translocation was detected during ischemia in embryonic and postnatal cardiomyocytes (Fig. 4A, panels B, D, F, and H, and Fig. 4C); however, this event was followed by caspase-3 cleavage (activation), and by nuclear fragmentation in embryonic (Fig. 1C and Fig. 4A, panels C and D) but not in postnatal cardiomyocytes (Fig. 4A, panels G and H).

AIF and EndoG are mitochondrial proteins that have been reported to act as executioners of PCD after their translocation to the cytosol (14, 27). AIF was released from mitochondria during cardiac ischemia (Fig. 4, B and C), but cytosolic AIF was smaller in size than mitochondrial AIF, as detected with an antibody raised against the C terminus of the protein (Fig. 4C). This is in agreement with the recently proposed apoptosis-induced cleavage of AIF at the N terminus, which allows its detachment from the inner mitochondrial membrane and subsequent translocation (36). This cleavage has been proposed to depend *in vitro* on calpain and/or cathepsin activity (35, 36). However, pretreatment of cardiomyocytes with the pan-cal-





**FIGURE 4. Ischemia triggers the translocation of mitochondrial regulators of programmed cell death cytochrome *c* and truncated AIF in cardiomyocytes independently of caspase activation.** *A*, immunofluorescence staining of cytochrome *c* (red) and cleaved caspase-3 (green), in embryonic (panels *A–D*) and postnatal (panels *E–H*) cardiomyocytes cultured in standard conditions (panels *A* and *E*), or after 6 h of ischemia. Chromatin is shown in blue. Panels *B* and *F* correspond to cytochrome *c*; panels *C* and *G* are cleaved caspase 3 expression and nuclear chromatin; panels *D* and *H* are overlay compositions. Arrows point to cells undergoing cytochrome *c* release, caspase-3 activation and nuclear fragmentation, and arrowheads point to cells undergoing cytochrome *c* release without caspase activation. Inset, high magnification of a representative apoptotic embryonic cell. *B*, AIF (green) and the mitochondrial marker Hsp60 (red) in control cardiomyocytes (control), or after 18 h of serum, glucose, and oxygen deprivation (ischemia). Overlay of AIF and Hsp60 images, orange means co-localization and green indicates AIF translocation. *C*, cytochrome *c* (Cyt.*c*) and AIF in cytosolic extracts of serum and glucose (S&G)-deprived, and ischemic cardiomyocytes. zV, 100  $\mu$ M pan-caspase inhibitor z-VAD.fmk; DQ, 30  $\mu$ M PARP inhibitor; Cl, 100  $\mu$ M calpain inhibitor MDL 28170. Cytosolic Lactate dehydrogenase (LDH) was used as a loading control, and cytochrome *c* oxidase subunit IV (COXIV) was detected as a marker for mitochondrial contamination. \*, full-length AIF. Each image in this figure is representative of three independent experiments.



**FIGURE 5. Ischemia induces EndoG release from cardiac mitochondria.** EndoG-FLAG was transfected in cardiomyocyte cultures as described under "Experimental Procedures." *A*, expression of exogenous EndoG-FLAG was examined by immunofluorescence with an anti-FLAG antibody in control cardiomyocyte cultures 3 days after transfection (*panels A and B*), and in cardiomyocytes exposed to 16 h of ischemia the 3rd day (*panels C and D*). *B*, EndoG-FLAG was detected in SDS-PAGE-electrophoresed total protein extracts and cytosolic protein extracts in control and ischemic cardiomyocytes. AIF and cytochrome *c* were detected to check the effectiveness of the ischemic treatment in releasing endogenous mitochondrial proteins. COXIV is a mitochondrial marker and LDH is a marker for the enrichment in cytosolic proteins. The images are representative of three independent experiments.

pain inhibitor MDL 28170 did not prevent AIF cleavage and its release during ischemia (Fig. 4C).

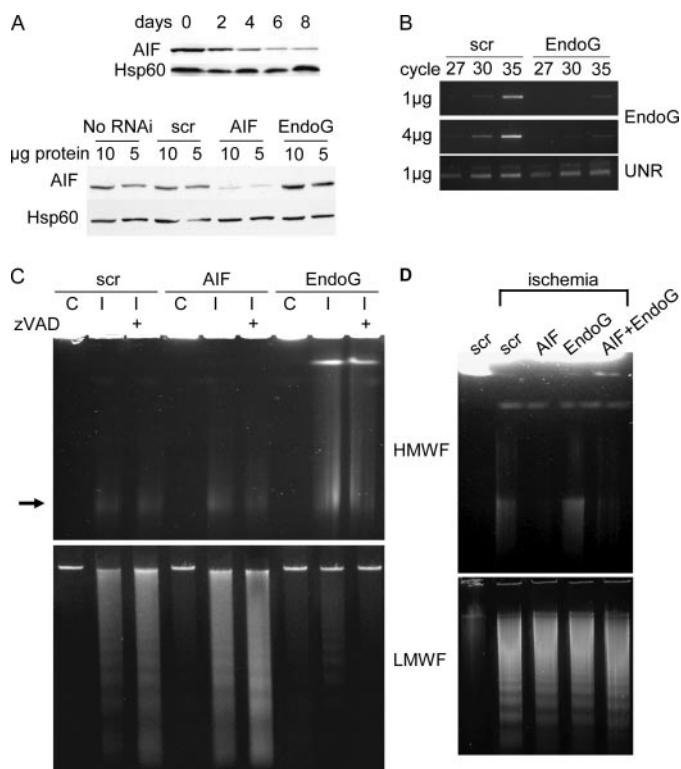
Ischemia-induced EndoG translocation was investigated by immunofluorescence and by Western blot with three commercial antibodies (supplemental Table S1). However, our results suggested that these antibodies are not specific when used on rat samples. We therefore constructed a plasmid for the overexpression of mouse EndoG with a C-terminal FLAG tag. EndoG-FLAG tracking demonstrated that EndoG had a punctuated pattern that excluded the nucleus under basal conditions, which is consistent with a mitochondrial localization (Fig. 5A, *panels A and B*). However, EndoG pattern changed during ischemia in accordance with its translocation to the cytosol and nucleus (Fig. 5A, *panels C and D*). We verified by

Western blot that overexpressed EndoG had the expected size of 32 kDa, and no cleavage bands were observed in ischemic cardiomyocyte extracts (Fig. 5B), suggesting that EndoG translocation was not dependent on its cleavage, contrary to AIF (Fig. 5B). Taken together, these results demonstrate that mitochondrial proteins cytochrome *c*, truncated AIF and EndoG are translocated to the cytosol in ischemic postnatal cardiomyocytes, yet caspases and calpains are not essential for their release.

*EndoG Is an Important Executor of DNA Processing during Ischemia in Cardiomyocytes*—The pattern of DNA cleavage in ischemic postnatal cardiomyocyte indicated the participation of caspase-independent mechanisms. AIF and EndoG have been suggested to execute cell death in the absence of caspase activation (14, 27). This prompted us to test if AIF and EndoG, which were released from mitochondria during ischemia, were responsible for cardiac cell death in this model. Cardiomyocytes were transduced with lentiviral vectors carrying constructs for small hairpin-based RNA interference (shRNAi) of either protein. Six days after transduction, cardiomyocytes were exposed to ischemia (see "Experimental Procedures"). The effectiveness of AIF shRNAi vector was evidenced by the decrease in AIF protein levels measured in cardiomyocyte total lysates (Fig. 6A). A time course analysis of AIF expression in cardiomyocytes transduced with the AIF-specific shRNAi plasmid showed that maximal reduction of AIF expression was achieved at day six after infection (Fig. 6A, *upper panel*). Therefore, all experiments were carried out at day six of transduction. AIF expression was reduced up to 80% in cardiomyocytes (Fig. 6A, *lower panel*). Reduction in EndoG expression was checked by RT-PCR from total RNA extracts to confirm the efficacy of the EndoG-specific shRNAi construct (Fig. 6B). Reduction in EndoG expression, but not in AIF levels, correlated with an important reduction of DNA damage (Fig. 6C). A faint ladder pattern was observed after electrophoresis of DNA from ischemic cardiomyocytes in which EndoG expression was reduced. This faint ladder was inhibited by z-VAD.fmk addition, suggesting a very low contribution of caspases (Fig. 6C). Interestingly, ischemia-induced DNA high molecular weight fragmentation was not blocked in cells with reduced EndoG expression, suggesting the presence of another yet unidentified AIF-independent, EndoG-independent nuclease working in the absence of caspase-activation. In contrast, AIF was essential for the ischemia-induced high molecular weight processing of DNA in skin fibroblasts (Fig. 6D), whereas the caspase-dependent DNase activity, but not EndoG, was involved in the low molecular weight DNA cleavage in these cells (Fig. 6D).

To ascertain whether the reduction in EndoG expression favored cardiomyocyte cell survival during ischemia, analysis of cell survival in scrambled-transduced, AIF-deficient and EndoG-deficient cardiomyocytes was performed. Neither AIF nor EndoG knockdown prevented ischemia-induced cardiac cell death, although reduction in AIF expression substantially blocked cardiac cell recovery during reoxygenation (Fig. 7). Altogether, these results reveal a main role of caspase-independent mechanisms in cardiomyocyte ischemic cell death, and identify EndoG as an essential executor of ischemia-induced DNA processing in these cells.

## EndoG Executes Ischemia-induced Cardiac DNA Processing

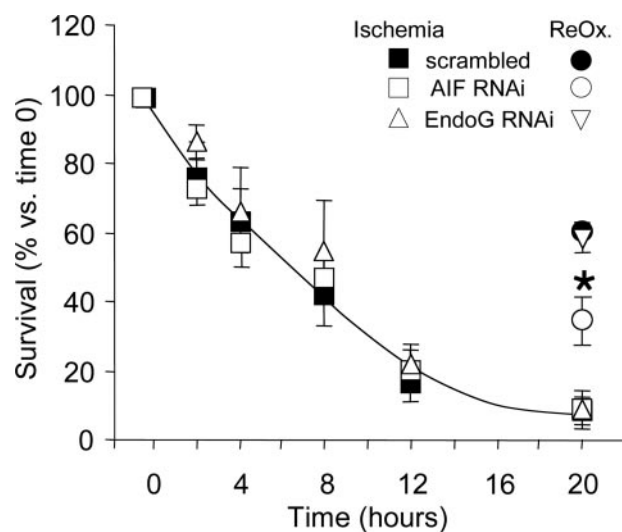


**FIGURE 6. Reduction of EndoG expression protects differentiated cardiomyocytes from ischemia-induced DNA fragmentation.** *A*, time course of AIF expression in cardiomyocytes transduced with an AIF-specific shRNAi construct (upper panel), and expression of AIF in 10 and 5  $\mu$ g of protein from total extracts of normal cardiomyocytes (No RNAi), scrambled-transduced (scr), AIF-deficient (AIF) and EndoG-deficient (EndoG) cardiomyocytes, 6 days after infection. Hsp60 was used as loading control. *B*, EndoG transcript levels in scrambled-transduced cardiomyocytes (scr) or EndoG-deficient cardiomyocytes (EndoG). RT-PCR was performed from 1 and 4  $\mu$ g of total RNA and equal volumes of the PCR product extracted at PCR cycles 27, 30, and 35 were loaded and electrophoresed in a SYBR Safe-stained 3% agarose gel. PCR reaction from 1  $\mu$ g of total RNA was conducted in parallel for amplification of the *unr* transcript, used as loading control. *C*, DNA high and low molecular weight fragmentation (HMWF and LMWF) induced by exposure to 18 h of ischemia with (+) or without 100  $\mu$ M z-VAD.fmk (zVAD), in scrambled-transduced (scr), AIF-deficient (AIF), and EndoG-deficient (EndoG) cardiomyocytes. Arrow indicates band at 50 kb. *D*, DNA high and low molecular weight fragmentation (HMWF and LMWF) induced by exposure to 18 h of ischemia in scrambled-transduced (scr), AIF-deficient (AIF), EndoG-deficient (EndoG), and AIF/EndoG double-knockdown skin fibroblasts. The images are representative of three independent experiments.

## DISCUSSION

The results presented here show that the silencing of the caspase-dependent machinery during cardiac differentiation (both *in vivo* and *in vitro*) accounts for the lack of caspase-dependent cell death during experimental ischemia. Our data also prove that the main pathway for DNA processing in cardiac cells involves the caspase-independent release of the mitochondrial endonuclease EndoG, which helps other caspase-independent, AIF-independent, DNases in the cleavage of cardiac DNA. Furthermore, our results suggest the presence of a previously not described caspase-independent nuclease activity that induces high molecular weight fragmentation of DNA in ischemic cardiomyocytes. Finally, the prosurvival role of AIF in cardiomyocytes during reoxygenation is described.

During an ischemic insult, postnatal cardiomyocytes do not activate caspases as readily as other cell types (9, 37). However,



**FIGURE 7. EndoG activity does not affect cardiomyocyte viability during ischemia and AIF limits cell death during reoxygenation.** Cardiomyocyte viability in ischemic cultures at several time points between 0 and 20 h (Ischemia). Survival was also counted in cardiomyocytes cultured for 2 h in ischemic conditions and then reoxygenated in standard medium for 18 h (ReOx.). Data are mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments made in duplicates. \*,  $p < 0.05$  AIF-deficient versus scrambled and EndoG-deficient at the same time point.

the underlying molecular mechanisms are not well understood because cardiac cells have been assumed to express a functional caspase-dependent pathway. Several molecules have been described to protect cardiomyocyte mitochondria by blocking cytochrome *c* release, and have been proposed to be apoptotic blockers in cardiomyocytes. Heat shock proteins have been suggested to be endogenous protectors against ischemic damage in cardiomyocytes (38, 39) by protecting mitochondrial function (40). Experimental overexpression of Bcl-2 or Bcl-X<sub>L</sub>, which block cytochrome *c* translocation, have been reported to be cardioprotective during ischemia/reoxygenation (41–43). Accordingly, the hearts of mice deficient for Bax, which induces cytochrome *c* release, are partially protected during ischemia (44). Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain (ARC) is highly expressed in the heart (45), and protects this organ against ischemic-induced cell death (46). ARC blocks cytochrome *c* release by interfering with Bax (47, 48). From the above-mentioned observations, it has been assumed that activation of the mitochondrial apoptotic pathway leading to executioner caspase activation is relevant in the cardiac ischemic damage. However, caspase activity was not measured (46), or it was only analyzed in the heart-derived cell line H9c2 (45, 47, 48). Importantly, heart-derived cell lines H9c2 and HL-1 (49) are not terminally differentiated cells and, contrary to cardiomyocytes, express all the apoptotic regulators.<sup>7</sup>

Furthermore, it is unknown why in conditions where caspase-dependent programmed cell death should be engaged (*i.e.* after cytochrome *c* release (50)), there was only low caspase activation in cardiomyocytes (51). What blocks cardiomyocyte apoptosis after cytochrome *c* release? We have previously described that cardiomyocytes lack significant Apaf-1 expression (4), and this could hamper the activation of caspase-9 after

<sup>7</sup> N. Bahi, J. Zhang, and D. Sanchis, unpublished data.

cytochrome *c* release. A recent report proposes that the low expression of Apaf-1 helps inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) to better counteract executioner caspase activation in cardiomyocytes, which were suggested to express caspases at a similar level than fibroblasts (52). Contrary to this work, the data reported here demonstrate a global down-regulation of the whole caspase-dependent machinery in the heart during development. Reduction in caspase expression is evident when comparing pure isolated embryonic and adult cardiomyocytes,<sup>7</sup> suggesting that most of the caspase expression in neonatal cardiomyocyte cultures comes from dividing cardiac fibroblasts, which usually contaminate cardiomyocyte cultures. In addition, our results discard an inhibition of caspase activation by ischemia-induced acidosis, because fibroblasts and embryonic cardiomyocytes do activate caspases in this setting, even at pH 6.1. Therefore, we propose that differentiation-related repression of the whole caspase-dependent machinery accounts for postnatal cardiac protection against caspase activation. We hypothesize that down-regulation of the apoptotic machinery during differentiation can be a mechanism for reducing caspase-induced cell damage by accidental cytochrome *c* translocation due to the high number of mitochondria and the constant change of cardiomyocyte volume during the contraction/relaxation cycle.

Our results demonstrate that cytochrome *c* translocation during cardiac ischemia is not linked to the caspase-dependent death pathway, contrary to the dogma that has been established in recent years. Nevertheless, mitochondrial damage is involved in ischemia-induced cardiomyocyte cell death and hampers cardiac recovery during reoxygenation. In this respect, truncated-AIF translocation from mitochondria was detected in ischemic cardiomyocytes. Of note, pharmacological calpain inhibition did not prevent ischemia-induced AIF cleavage and release. This fact discards an essential role of calpains in AIF translocation and release in ischemic cardiomyocytes. In our experimental model, AIF release did not account for ischemia-induced cardiac DNA damage. Furthermore, we show that AIF depletion hampers cardiac survival during reoxygenation. Importantly, the ischemic lesion is bigger in the AIF-defective Harlequin mouse (25). In addition, we have recently shown that AIF is not related to DNA damage in staurosporine-treated neuroblastoma cells (53). Therefore, our data suggest that AIF role in DNA cleavage depends on the cell type and does not support a relevant role for AIF in cardiac DNA processing.

The present study also reveals that EndoG is the main contributor for the DNA low molecular weight degradation in ischemic cardiomyocytes. Interestingly, two recent works reported no obvious effects on cell death and DNA degradation in EndoG-deficient mice (29, 30). However, DNA integrity analysis was studied in splenocytes, which otherwise activate caspase-dependent apoptosis (29). It must be taken into account that Li *et al.* showed the EndoG role in mammalian apoptotic DNA degradation in fibroblasts deficient for caspase-activated DNase (27). Furthermore, here we show that EndoG silencing in primary skin fibroblasts, which express caspases, does not induce a reduction in DNA cleavage. Taken together, these results suggest that EndoG cleaves DNA in systems where

caspases are absent, irrespective of the death stimulus, and could be the final step of DNA processing in postmitotic cells.

Finally, our results show that high molecular weight fragmentation of DNA is caspase-independent in dividing fibroblasts and postmitotic cardiomyocytes and that AIF is involved in this step of DNA degradation only in proliferating skin fibroblasts but not in cardiomyocytes. Indeed, a functional genomic approach in *C. elegans* has highlighted the involvement of many genes in the final apoptotic DNA degradation process, which could be controlling the final cell fate (54). Therefore, we are currently investigating the identity of the nuclease activities involved in the ischemia-induced DNA high molecular weight fragmentation.

In summary, the involvement of caspases in cardiac cell death has been based on the assumption that the caspase-dependent machinery is expressed in differentiated cardiomyocytes and has been inferred mainly from the experimental evidence of cytochrome *c* translocation and the cleavage of DNA rendering 3'-OH ends, which are detected by the TUNEL assay, a characteristic feature of the caspase-dependent DNase CAD/DFF40, but that can be also produced by EndoG (55). In contrast, here we show that cardiomyocytes reduce the expression of the caspase-dependent cell death machinery during differentiation and that these proteins are not up-regulated during ischemia. Our results show that, after differentiation, caspase-independent mechanisms substitute for caspases in the ischemic cell damage of cardiomyocytes. Furthermore, our data disclose the essential role of EndoG, which works in concert with a yet unidentified nuclease activity, as an important executor of caspase-independent DNA cleavage in differentiated cardiomyocytes.

*Acknowledgments*—We thank Dr. Trono for the kind gift of the lentiviral plasmids, Isabel Sánchez and Roser Pané for valuable technical assistance, and Rebeca Botas-Desforges and Dr. Andrew Ward for proofreading the manuscript.

## REFERENCES

- Nicholson, D. W. (1999) *Cell Death Differ.* **6**, 1028–1042
- Daniel, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) *Cell* **116**, 205–219
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., and Wang, X. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8461–8466
- Sanchis, D., Mayorga, M., Ballester, M., and Comella, J. X. (2003) *Cell Death Differ.* **10**, 977–986
- Yakovlev, A. G., Ota, K., Wang, G., Movsesyan, V., Bao, W. L., Yoshihara, K., and Faden, A. I. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 7439–7446
- Wright, K. M., Linhoff, M. W., Potts, P. R., and Deshmukh, M. (2004) *J. Cell Biol.* **167**, 303–313
- Kubasiak, L. A., Hernandez, O. M., Bishopric, N. H., and Webster, K. A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12825–12830
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., Reed, J. C., and Anversa, P. (1997) *N. Engl. J. Med.* **336**, 1131–1141
- Kostin, S., Pool, L., Elsasser, A., Hein, S., Drexler, H. C., Arnon, E., Hayakawa, Y., Zimmermann, R., Bauer, E., Klovekorn, W. P., and Schaper, J. (2003) *Circ. Res.* **92**, 715–724
- Bialik, S., Geenen, D. L., Sasson, I. E., Cheng, R., Horner, J. W., Evans, S. M., Lord, E. M., Koch, C. J., and Kitsis, R. N. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 1363–1372
- Mehrfhof, F. B., Muller, F. U., Bergmann, M. W., Li, P., Wang, Y., Schmitz, W., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (2001) *Circulation* **104**, 2088–2094

12. Jayasankar, V., Woo, Y. J., Bish, L. T., Pirollo, T. J., Chatterjee, S., Berry, M. F., Burdick, J., Gardner, T. J., and Sweeney, H. L. (2003) *Circulation* **108**, 230–236
13. Misra, A., Haudek, S. B., Knuefermann, P., Vallejo, J. G., Chen, Z. J., Michael, L. H., Sivasubramanian, N., Olson, E. N., Entman, M. L., and Mann, D. L. (2003) *Circulation* **108**, 3075–3078
14. Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 1331–1341
15. Arnould, D., Parone, P., Martinou, J. C., Antonsson, B., Estaquier, J., and Ameisen, J. C. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 923–929
16. Arnould, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., and Youle, R. J. (2003) *EMBO J.* **22**, 4385–4399
17. 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., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999) *Nature* **397**, 441–446
18. Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., and Kroemer, G. (2000) *FASEB J.* **14**, 729–739
19. Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G., and Slack, R. S. (2002) *J. Cell Biol.* **158**, 507–517
20. Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., and Kroemer, G. (2004) *Cell Death Differ.* **11**, 591–595
21. Wang, H., Yu, S. W., Koh, D. W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 10963–10973
22. Cheung, E. C., Melanson-Drapeau, L., Cregan, S. P., Vanderluit, J. L., Ferguson, K. L., McIntosh, W. C., Park, D. S., Bennett, S. A., and Slack, R. S. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 1324–1334
23. Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellechia, M., Blomgren, K., and Plesnila, N. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 10262–10272
24. Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T., and Ackerman, S. L. (2002) *Nature* **419**, 367–374
25. Van Empel, V. P., Bertrand, A. T., van der Nagel, R., Kostin, S., Doevendans, P. A., Crijns, H. J., de Wit, E., Sluiter, W., Ackerman, S. L., and De Windt, L. J. (2005) *Circ. Res.* **96**, e92–e101
26. Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002) *Science* **298**, 1587–1592
27. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001) *Nature* **412**, 95–99
28. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001) *Nature* **412**, 90–94
29. Irvine, R. A., Adachi, N., Shibata, D. K., Cassell, G. D., Yu, K., Karanjawala, Z. E., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 294–302
30. David, K. K., Sasaki, M., Yu, S. W., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2006) *Cell Death Differ.* **13**, 1147–1155
31. Mayorga, M., Bahi, N., Ballester, M., Comella, J. X., and Sanchis, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 34882–34889
32. Ravassa, S., Fortuño, M. A., González, A., López, B., Zalba, G., Fortuño, A., and Díez, J. (2000) *Hypertension* **36**, 1065–1071
33. Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X., and Garrard, W. T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48404–48409
34. Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., and Dawson, V. L. (1997) *Nat. Med.* **3**, 1089–1095
35. Polster, B. M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J. M., and Nicholls, D. G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 6447–6454
36. Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N., and Mihara, K. (2005) *EMBO J.* **24**, 1375–1386
37. Scarabelli, T. M., Stephanou, A., Pasini, E., Comini, L., Raddino, R., Knight, R. A., and Latchman, D. S. (2002) *Circ. Res.* **90**, 745–748
38. Marber, M. S., Mestril, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., Yellon, D. M., and Dillmann, W. H. (1995) *J. Clin. Investig.* **95**, 1446–1456
39. Nakano, M., Mann, D. L., and Knowlton, A. A. (1997) *Circulation* **95**, 1523–1531
40. Gupta, S., and Knowlton, A. A. (2002) *Circulation* **106**, 2727–2733
41. Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (2001) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2313–H2320
42. Huang, J., Ito, Y., Morikawa, M., Uchida, H., Kobune, M., Sasaki, K., Abe, T., and Hamada, H. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 64–70
43. Chatterjee, S., Stewart, A. S., Bish, L. T., Jayasankar, V., Kim, E. M., Pirollo, T., Burdick, J., Woo, Y. J., Gardner, T. J., and Sweeney, H. L. (2002) *Circulation* **106**, I212–I217
44. Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., Tobar, A., and Vidne, B. A. (2003) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**, H2351–H2359
45. Ekhterae, D., Lin, Z., Lundberg, M. S., Crow, M. T., Brosius, F. C. 3<sup>rd</sup>, and Nunez, G. (1999) *Circ. Res.* **85**, e70–e77
46. Gustafsson, A. B., Sayen, M. R., Williams, S. D., Crow, M. T., and Gottlieb, R. A. (2002) *Circulation* **106**, 735–739
47. Gustafsson, A. B., Tsai, J. G., Logue, S. E., Crow, M. T., and Gottlieb, R. A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21233–21238
48. Nam, Y. J., Mani, K., Ashton, A. W., Peng, C. F., Krishnamurthy, B., Hayakawa, Y., Lee, P., Korsmeyer, S. J., and Kitsis, R. N. (2004) *Mol. Cell* **15**, 901–912
49. Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., and Izzo, N. J., Jr. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2979–2984
50. Akao, M., O'Rourke, B., Teshima, Y., Seharaseyon, J., and Marban, E. (2003) *Circ. Res.* **92**, 186–194
51. Teshima, Y., Akao, M., Jones, S. P., and Marban, E. (2003) *Circulation* **108**, 2275–2281
52. Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C., and Deshmukh, M. (2005) *J. Cell Biol.* **171**, 925–930
53. Yuste, V. J., Sanchez-Lopez, I., Sole, C., Moubarak, R. S., Bayascas, J. R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S. A., and Comella, J. X. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 35670–35683
54. Parrish, J. Z., and Xue, D. (2003) *Mol. Cell* **11**, 987–996
55. Cummings, O. W., King, T. C., Holden, J. A., and Low, R. L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2005–2015

## **Annex 3:**

---



# Developmental silencing and independency from E2F of apoptotic gene expression in postmitotic tissues

Jisheng Zhang<sup>a</sup>, Núria Bahi<sup>a</sup>, Ana M. Zubiaga<sup>b</sup>, Joan X. Comella<sup>a,c</sup>,  
Marta Llovera<sup>a</sup>, Daniel Sanchis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomedical Research Institute of Lleida (IRBLLEIDA), Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

<sup>b</sup> Facultat de Ciències, Genètica, Antropologia Física y Fisiologia Animal, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain

<sup>c</sup> Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain

Received 7 September 2007; revised 5 November 2007; accepted 15 November 2007

Available online 26 November 2007

Edited by Jesus Avila

**Abstract** The involvement of caspases in postmitotic cell death is controversial. Here we report that adult brain and heart are devoid of many key pro-apoptotic proteins due to a progressive postnatal silencing event involving a reduction of their transcript levels. E2F has been shown to control cell cycle progression and to be transcriptional activator of apoptotic genes. However, our data demonstrate that apoptotic gene expression in heart, brain and liver, as well as cardiac and neuronal apoptotic gene silencing during development, are E2F-independent events. Therefore, the genes regulating caspase-dependent cell death are expressed in embryonic organs in an E2F-independent manner and a developmental-related silencing event represses these genes in postmitotic adult tissues.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Heart; Brain; Development; Apoptosis; Caspase; E2F

## 1. Introduction

Deregulation of the caspase-dependent cell death process has been involved in the onset and progression of autoimmune diseases [1,2], and cancer [3,4]. However, despite a considerable effort directed to untangling the processes implicated in cardiac and neuronal diseases involving cell loss, the relevance of caspases in these diseases remains debated. Many reports of cytochrome c translocation, nuclear condensation and chromatin DNA degradation during cardiac and neuronal disease suggest the involvement of caspases in these situations. However, other reports have challenged the relevance of caspase activation in cardiomyocyte and neuron death in these pathologies [5–9]. Changes in the expression of key regulators of the cell death pathway related to the experimental models used, which include from cell lines to adult animals, could underlie the differences in the results.

We previously reported that although embryonic cardiomyocytes express the proteins regulating caspase activation, low levels of these proteins are found in the adult heart, concomitant with a switch to caspase-independent mechanisms being in-

involved in ischemia-induced cardiomyocyte damage [9]. Others have reported low levels of Apaf-1 in cortical neurons [10], retinal neurons [7] and sympathetic neurons [11], as well as low levels of caspase-3 and pro-apoptotic Bcl-2 family members in retinal neurons [7,8]. However, some reports have shown high expression of caspases 3 and 9 in neonatal neurons [11], sustained caspase-9 expression in brain [10,12,13] and high expression of Apaf-1 and some caspases in the heart [13–15]. Therefore, controversy exists about the extent and magnitude of the changes on apoptotic gene expression in postmitotic cells.

Our aim was to characterize the timing and broadness of the silencing event affecting the genes regulating the caspase-dependent death pathway during heart and brain development, and to get some clues into the underlying mechanisms. We show that the developmental-related silencing of the main genes involved in the control of caspase-dependent cell death affect the heart and the brain, and to a lesser extent the liver, in both rat and mouse. In general, this event initiates after birth in rodents and culminates during adulthood, with some genes being expressed only in embryos, such as Caspase-2, and others, like Bcl-XL, expressed steadily until adulthood. The apoptotic genes are not re-expressed *in vitro* in adult cardiomyocytes during stress situations. Our results also show that embryonic expression of the caspase-dependent cell death machinery and its silencing is not influenced by the transcription factor E2F1, despite the fact that E2F1 controls the expression of some of these genes in other cell types.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, tissues and cells

Sprague–Dawley rats were housed in our Experimental Animal Service under standard conditions. Wild-type and mice deficient for E2F1, E2F2 or both genes were housed and kept at the Animal Facility, University of the Basque Country, as previously reported [16]. Animals were sacrificed in compliance with the guidelines defined by our Institutional Ethical Committee, which approved the experimental design of this project. Heart, brain and liver were dissected, minced into small cubes, rinsed with cold phosphate buffered saline and snap-frozen into liquid nitrogen. Embryonic and adult cardiomyocytes were prepared and stored as described elsewhere [9]. Other primary cells, tissues and cell lines were a kind gift from members of our lab.

### 2.2. Adult ventricular myocyte culture and lentiviral infection

Adult ventricular myocytes were obtained from 9-month-old male Sprague–Dawley rats and cultured as previously described [9]. Plates were either treated with 1 or 10 nM Angiotensin-II (SIGMA) for

\*Corresponding author. Fax: +34 973702213.

E-mail address: daniel.sanchis@cmb.udl.cat (D. Sanchis).



48 h in standard medium as described by others [17] or submitted to 6 h of ischemia (Tyrode's solution, 0.1% O<sub>2</sub> in an InVivo400 hypoxic chamber, see details in [9]) followed by 18 h of reoxygenation in standard medium, as described by Kang et al. [18], or left untreated. For inducing E2F1 expression, the fragment HindIII–EcoRI of the vector pRc/CMV-HA-E2F1 (kind gift of Erik K Flemington, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA), containing the open reading frame of human E2F1 followed by a hemagglutinin tag (HA) was subcloned into the PmeI site of the lentiviral overexpression vector pWPI, then lentivirus particles carrying the empty vector or the E2F1 expression vector were obtained and added to the cell cultures as described previously [9] for 72 h. E2F1 expression was monitored by immunodetection of the HA tag.

### 2.3. Detection of protein expression

Protein expression was detected in protein extracts diluted in Tris-buffered 2% SDS solution at pH 6.8 as previously reported [9]. Antibody data can be found in the [Supplementary Table 1](#). Each immunodetection was repeated with two to three different membranes containing samples coming from different animals of each age.

### 2.4. Analysis of the steady-state transcript levels

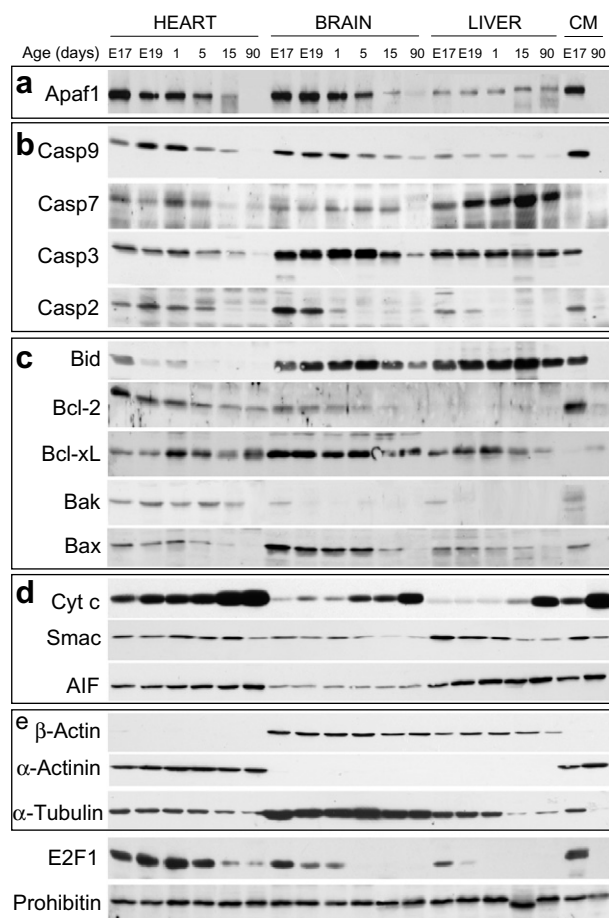
Total RNA was obtained from frozen tissues with the RNA Spin Mini kit (GE Healthcare). RNA concentration measurements and retrotranscription were done as described [9]. Equal volumes of cDNA were amplified by PCR using a couple of specific primers expanding at least two exons within the gene of interest (see [Supplementary Table 2](#) for details) as described elsewhere [9]. Ten microlitre aliquots were taken at PCR cycles 25, 30 and 35, mixed with SYBR Safe dye (Invitrogen) and migrated in a 1% agarose gel. Densitometry of the DNA bands was performed with the Scion Image software (Scion Corporation) and qualitative calculations were done comparing data from non-saturated products (usually, corresponding to PCR cycle 30). Loading was checked by amplification of the *unr* transcript [9]. Transcript analysis was performed from three samples of each tissue coming from different animals.

## 3. Results

### 3.1. Expression of the genes implicated in the caspase-dependent signalling is silenced during postnatal development, notably in heart and brain

Expression of proteins involved in the control of caspase-dependent cell death was analyzed in tissues from rats of different ages ranging from embryos to adults by using the antibodies described in [Supplementary Table 1](#). Antibodies that have been checked against knock out mice or knocked down cultured cells were used when possible. Our results show that the genes involved in the induction of cell death were intensely repressed in the adult heart and, most of them, also in the brain. Exceptions were caspase-2, which was only expressed in embryos, and Bak and Bax, which were downregulated in all tissues during postnatal development ([Fig. 1](#) and [Supplementary Fig. 1](#)). The expression of caspase-9 and executioner caspases 3 and 7 was reduced in postnatal heart and brain. We checked the specificity of caspase-9 antibodies supplied by Alexis and Cell Signaling comparing the signal obtained in the same blot for human and rodent cells ([Supplementary Fig. 2](#)). We concluded that caspase-9 expression is reduced in adult heart and brain when compared to the embryonic stage. With regard to the expression of anti-apoptotic proteins, Bcl-2 was silenced in heart and brain during development and undetectable in the liver, whereas Bcl-XL was expressed in all tissues until adulthood ([Fig. 1](#)).

Decreased expression of the proteins involved in caspase-dependent cell death has been frequently associated with



**Fig. 1.** Detection of proteins involved in apoptosis at different developmental stages in heart, brain and liver. Protein extracts from cardiac ventricles, brain homogenate and liver were collected from rats at ages ranging from embryonic day 17 (E17) to 3-month-old adults. Protein detection was carried out with the antibodies listed in the [Supplementary Table 1](#). The image is representative of the results obtained with samples coming from three different animals per age. a: Adaptor proteins; b: caspases; c: Bcl-2 family proteins; d: mitochondrial proteins (Cyt *c*: cytochrome *c*); and e: structural proteins. CM: primary isolated rat cardiomyocytes.

post-translational modifications, involving a reduction of protein stability [19]. To ascertain whether the developmental silencing process affected the steady-state amount of the corresponding transcripts, we performed semi-quantitative RT-PCR in RNA extracts from embryo and adult tissues, as described in Section 2. Our results demonstrated that expression silencing affects the amount of mRNA pointing to a decrease in transcription ([Fig. 2](#)).

### 3.2. E2F1 is neither involved in apoptotic gene expression in the embryo nor does its development-linked repression affect apoptotic gene expression in adult tissues

E2F transcription factors are well known by their role in the control of cell cycle progression. Recently, E2F1 has been suggested to be transcriptional activator of some genes regulating the caspase activation cascade, such as Apaf-1 [20–23], caspase-8 [24,25], caspase-3 [23,25], caspase-7 [22,23,25], Bid [24] and Smac [26]. Our results showed that E2F1 expression decreases during differentiation in all tissues analyzed and its

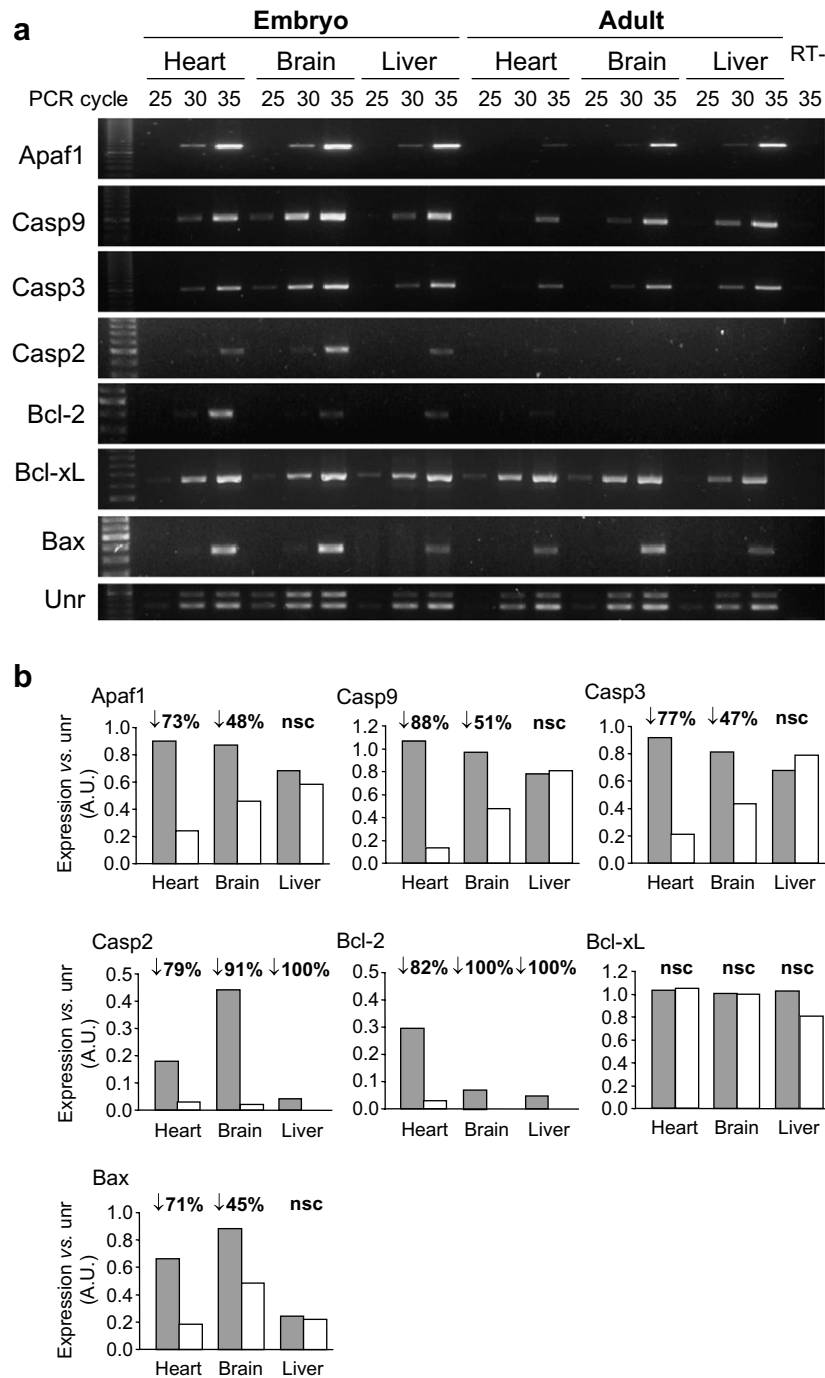


Fig. 2. Analysis of the transcript levels for different genes involved in apoptosis, in embryonic and adult heart, brain and liver. (a) Total RNA was extracted from cardiac ventricles, brain homogenate and liver of E17 embryos and 3-month-old rats. RNA was retrotranscribed and the expression of the genes of interest was measured by PCR as described in Section 2. RT-: PCR product at cycle 35 from a non-retrotranscribed neonatal heart RNA sample. (b) Bar graphs represent the semi-quantification of each specific gene in arbitrary units (A.U.), corrected by loading (upstream of n-Ras gene expression); gray bars: E17 embryo; white bars: 3-month-old adult. For each gene, differences between embryo and adult expression are shown as percentage. Values are percent expression change between embryo and adult. nsc: no significant change. Graphs are representative of three experiments made with independent tissue samples.

expression level is proportional to the expression levels of many apoptotic genes in the embryo, pointing to a role of E2F in the control of the genes regulating caspase-dependent death in heart, brain and liver (Fig. 1). However, E2F1 and E2F2 single and double knockout mice showed no differences neither in the embryonic expression of these genes nor in their

repression during development when compared with their wild-type littermates (Fig. 3). These data demonstrated that, although E2F factors can act as transcriptional activators of key genes regulating the caspase signalling cascade in embryonic and tumor cells, they do not control the normal expression of these genes in heart, brain and liver.

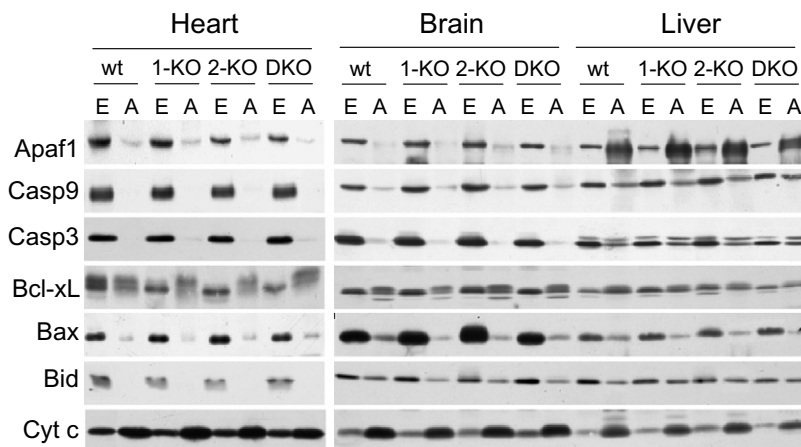


Fig. 3. Expression of proteins involved in apoptosis in the heart, brain and liver of embryos and adult mice from wild-type and E2F1, E2F2 or double E2F1-2 knock out strains. Total protein extracts were obtained as described in Section 2 and protein expression was detected by Western blot using the antibodies listed in the Supplementary Table 1. Images are representative of three independent experiments with comparable results. wt, wild-type; KO, E2F knockout; DKO, E2F1-2 double knockout. E: E19 embryo; A: P60 adult.

3.3. The main regulators of the caspase-dependent cell death are not re-expressed in cultured adult cardiomyocytes submitted to stress stimuli

In order to investigate whether the apoptotic machinery can be re-expressed after a stress input, the expression of apoptotic genes was analyzed in primary adult ventricular myocytes cultured for 48 h with 1 or 10 nM Angiotensin-II, which has been reported to induce hypertrophy as well as apoptotic-like DNA damage and cell death [17], or in cardiomyocytes after 6 h of ischemia and 18 h of reoxygenation, which induces cell death, cytochrome c release and apoptotic-like DNA degradation [18]. The major regulators of the caspase-dependent death pathway were not re-expressed during these treatments (Fig. 4). Enhanced E2F1 expression can activate the expression of genes involved in apoptosis in embryonic fibroblasts and cell lines [25]. In order to verify whether E2F1 has similar effects in adult ventricular myocytes, expression of apoptotic genes was analyzed three days after E2F1 transduction in these cells. Despite the increase in E2F1 expression, cardiomyocytes did not re-express any of the apoptotic genes (Fig. 4). Taken together, our results suggest that adult cardiac myocytes loss the ability to express the genes that regulate the caspase-dependent death pathway and, therefore, cytochrome c release, DNA damage and phosphatidylserine externalization [17,18] are likely caspase-independent events in these cells.

4. Discussion

Here we report that the proteins controlling caspase-dependent cell death are expressed in the embryonic heart, brain and liver, but are later silenced during postnatal development, especially in the heart and the brain. Of note, the expression of many genes controlling intermediate steps leading to caspase activation is always low in the liver, whose sensitivity to caspase-dependent cell death could depend on the high expression of Bid and executioner caspases 3 and 7. The gene silencing event implies a reduction in the amount of the transcripts coding for these proteins. Our analysis also demonstrates that E2F factors are not involved in the expression of the major

regulators of the caspase signalling cascade in the embryonic heart, brain and liver. Finally, the results presented here suggest that postmitotic cardiomyocytes do not re-express the

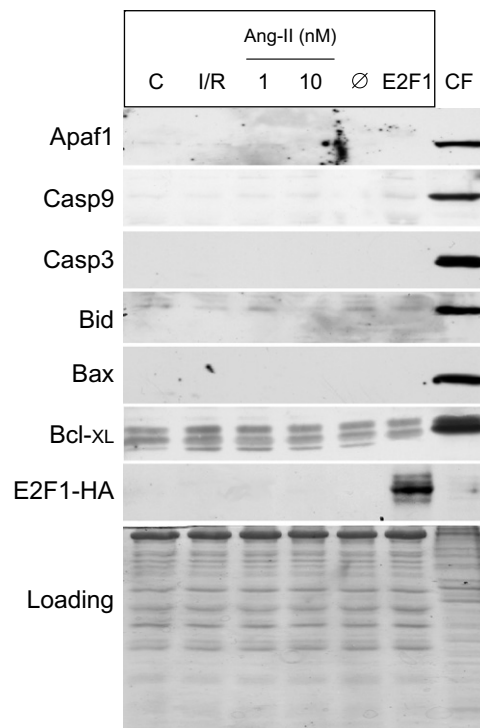


Fig. 4. The expression of the major apoptotic regulators is not enhanced in adult cardiomyocytes submitted to different stress stimuli reported to induce cell damage. Rat adult ventricular myocytes were treated with 1 or 10 nM Angiotensin-II (Ang-II) for 48 h, 6 h of ischemia and 18 h of reoxygenation (I/R), or were induced to overexpress E2F1 for 72 h (see Section 2). The expression of several genes involved in the caspase-dependent cell death pathway was immunodetected after SDS-PAGE in total protein extracts from control cardiomyocytes (C), cardiomyocytes transduced with empty vector (Ø) and stressed cardiomyocytes. Control neonatal cardiac fibroblasts (CF). The image is representative of three independent experiments.

apoptotic genes neither during stress nor after an increase in E2F1 expression.

Although previous reports have shown that the expression of some apoptotic proteins is reduced in postnatal animals [7–15], simultaneous data argue in favour of high expression of some of these proteins [10–15]. From our point of view, clarifying this fact has important consequences for the correct understanding of the mechanisms engaged in cardiomyocyte and neuron cell death in the adult. Indeed, outstanding research on neurodegenerative and cardiac diseases is being frequently conducted or complemented with studies performed with embryonic cells and immortalized cell lines, which express the full caspase-dependent death machinery. Using these models, caspase activation has been proposed to play a relevant role in cardiomyocyte and neuron death during disease [27–29]. However, although the role of caspase-dependent events on the morphogenesis of the brain and the heart are well established [30–32], the role of caspases in postmitotic cell death is controversial [5–7,33].

Our results show that the pro-death genes in the caspase-dependent pathway are repressed at both protein and transcript level during development, in apparent contradiction with previous reports [14,15]. Although reduction in Apaf-1 expression and relatively unchanged levels of caspase-9 are observed when comparing embryos with early neonatal cardiomyocytes [15], in the present work we show that adult fully differentiated cardiomyocytes lack both proteins. A previous work showed that caspase-9 expression increases during heart development [14]. However, the size of the caspase-9 band shown in that report was smaller than expected and varied in size when comparing heart and brain extracts. We checked the specificity of two commercial antibodies against caspase-9. We found that only one antibody detected correctly the different size of the human and rodent caspase-9 isoforms. This antibody detected caspase-9 only in embryonic and at lesser extent in young heart, but not in adult heart and adult isolated cardiomyocytes. Therefore, we conclude that caspase-9 is actually silenced during development in heart and brain, alike the rest of caspases analyzed. Caspase-9 has been suggested to be expressed in adult mouse heart both at the protein and transcript levels [13]. In support of the decrease in caspase-9 expression in the myocardium, we report here that isolated adult cardiomyocytes are virtually devoid of caspase-9 (Figs. 1 and 4), suggesting that the remnant caspase-9 signal in adult heart comes from non-muscular cells. In addition, we have taken into account only non-saturated signals for our comparative transcript analysis (Fig. 2), which confirm an important decrease in caspase-9 transcript both in the heart and the brain.

If the key regulators of the caspase-dependent cell death pathway are silenced in postmitotic tissues, the suggested involvement of caspases in cardiac and neuronal diseases in the adult (e.g. [28,29,34]) could depend on the re-expression of the apoptotic signalling cascade in certain pathological conditions. The results presented here suggest that cultured primary adult cardiomyocytes can not re-express the apoptotic genes *in vitro* when submitted to certain death stimuli, although this does not rule out the re-expression of apoptotic genes *in vivo*. In neurons, expression of Apaf-1 has been reported to be enhanced in a model of brain injury [10] and Caspase-2 up-regulation occurs in certain neurons of a Huntington's disease mouse model [29]. However, experiments conducted to identify the mechanisms involved in neuronal and cardiac cell

death during disease have been performed usually in embryonic cells. Our results put forward a note of caution on the interpretation of results obtained with embryonic cells or cell lines. We suggest the need to prove the implication of caspases in adult cells to confirm the apoptotic gene re-expression event, which would have important clinical consequences.

Our results also show that expression of apoptosis inducing factor (AIF), a potentially deleterious protein, is increased in the adult heart. Interestingly, we and others have demonstrated that AIF plays actually a beneficial role during reoxygenation in cardiomyocytes [35,9], and protects the heart and the brain against oxidative damage [35,36]. Another interesting fact is that the expression of pro-death proteins Bax and Bak, thought to play redundant roles, vary when comparing different tissues. While both Bax and Bak are expressed in the young heart, Bak is the major Bcl-2-related pro-death member in the brain, whereas Bax is more expressed than Bak in the liver. These results suggest that the relevance of Bak and Bax in the control of the mitochondrial events leading to cytochrome c release is tissue-specific. Finally, our results show that Bcl-XL expression is sustained at significant levels until adulthood, suggesting that it could be a crucial protector of mitochondrial integrity in the adult brain and heart.

Regarding the mechanisms involved in apoptotic gene down-regulation, our data discard an essential role of E2F1, despite the fact that this protein has been involved in the expression of key regulators of the caspase-dependent pathway in proliferating cells and in the immune system [20–26,37–40]. The lack of effects on the expression of these genes in E2F1 and 2 double null mice is unlikely due to compensation by other members of the E2F1 family because E2F1 has been described to be the only member able of inducing apoptotic gene expression [39], and because the ability of other E2F proteins for inducing apoptosis rely on endogenous E2F1 expression [40].

*Acknowledgements:* We thank Jon Fernández for subcloning the E2F1-HA sequence into the pWPI vector. The work was partially supported by a Grant (SAF2005-02197) from the Ministry of Education and Science of Spain (MEC) to D.S., a Grant “Suport als Grups de Recerca” from the Government of Catalonia to JXC/MLL/DS and a Grant (SAF2005-07930-C02-01) to AMZ. DS and MLL are Ramón y Cajal MEC fellows; NB is recipient of a PhD fellowship from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (Government of Catalonia). J.Z. is recipient of a PhD fellowship from MEC.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.febslet.2007.11.046](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.046).

## References

- [1] Russell, J.H. and Ley, T.J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323–370.
- [2] Stassi, G. and De Maria, R. (2002) Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 195–204.
- [3] Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- [4] Jaattela, M. (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23, 2746–2756.

- [5] Ohno, M., Takemura, G., Ohno, A., Misao, J., Hayakawa, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T. and Fujiwara, H. (1998) "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with in situ nick end-labeling. *Circulation* 98, 1422–1430.
- [6] Knaapen, M.W., Davies, M.J., De Bie, M., Haven, A.J., Martinet, W. and Kockx, M.M. (2001) Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 51, 304–312.
- [7] Donovan, M. and Cotter, T.G. (2002) Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ.* 9, 1220–1231.
- [8] Donovan, M., Doonan, F. and Cotter, T.G. (2006) Decreased expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members during retinal development and differential sensitivity to cell death. *Dev. Biol.* 291, 154–169.
- [9] Bahi, N., Zhang, J., Llovera, M., Ballester, M., Comella, J.X. and Sanchis, D. (2006) Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 22943–22952.
- [10] Yakovlev, A.G., Ota, K., Wang, G., Movsesyan, V., Bao, W.L., Yoshihara, K. and Faden, A.I. (2001) Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 21, 7439–7446.
- [11] Wright, K.M., Linhoff, M.W., Potts, P.R. and Deshmukh, M. (2004) Decreased apoptosome activity with neuronal differentiation sets the threshold for strict IAP regulation of apoptosis. *J. Cell Biol.* 167, 303–313.
- [12] Stoka, V., Turk, V. and Bredesen, D.E. (2006) Differential regulation of the intrinsic pathway of apoptosis in brain and liver during ageing. *FEBS Lett.* 580, 3739–3745.
- [13] Madden, S.D., Donovan, M. and Cotter, T.G. (2007) Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 415–423.
- [14] Han, Y., Chen, Y.S., Liu, Z., Bodyak, N., Rigor, D., Bisping, E., Pu, W.T. and Kang, P.M. (2006) Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circ. Res.* 99, 415–423.
- [15] Potts, M.B., Vaughn, A.E., McDonough, H., Patterson, C. and Deshmukh, M. (2005) Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J. Cell Biol.* 171, 925–930.
- [16] Iglesias, A., Murga, M., Laresgoiti, U., Skoudy, A., Bernales, I., Fullaondo, A., Moreno, B., Lloreta, J., Field, S.J., Real, F.X. and Zubiaga, A.M. (2004) Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *J. Clin. Invest.* 113, 1398–1407.
- [17] Cigola, E., Kajstura, J., Li, B., Meggs, L.G. and Anversa, P. (1997) Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp. Cell Res.* 231, 363–371.
- [18] Kang, P.M., Haunstetter, A., Aoki, H., Usheva, A. and Izumo, S. (2000) Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ. Res.* 87, 118–125.
- [19] Yang, Y. and Yu, X. (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 17, 790–799.
- [20] Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzarini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Ceconi, F., Muller, H. and Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* 3, 552–558.
- [21] Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., Nakamura, M., Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y. and Nakamura, M. (2002) Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 39760–39768.
- [22] Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., Gulino, A. and Leviero, M. (2003) Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 5, 552–558.
- [23] Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Gene Dev.* 15, 267–285.
- [24] Cao, Q., Xia, Y., Azadiv, M. and Crispe, I.N. (2004) The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J. Immunol.* 173, 1111–1117.
- [25] Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Barsagi, D. and Lowe, S.W. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4, 859–864.
- [26] Xie, W., Jiang, P., Miao, L., Zhao, Y., Zhimin, Z., Qing, L., Zhu, W.G. and Wu, M. (2006) Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acid Res.* 34, 2046–2055.
- [27] Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S. and Nicholson, D.W. (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395–406.
- [28] Nam, Y.J., Mani, K., Ashton, A.W., Peng, C.F., Krishnamurthy, B., Hayakawa, Y., Lee, P., Korsmeyer, S.J. and Kitsis, R.N. (2004) Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through non-homotypic death-fold interactions. *Mol. Cell.* 15, 901–912.
- [29] Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, A.S., Logvinova, A.V., Peel, A.L., Chen, S.F., Hook, V., Singaraja, R., Krajewski, S., Goldsmith, P.C., Ellerby, H.M., Hayden, M.R., Bredesen, D.E. and Ellerby, L.M. (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ.* 11, 424–438.
- [30] Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M. and Mak, T.W. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739–750.
- [31] Ceconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A. and Gruss, P. (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94, 727–737.
- [32] Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter Jr., G.A., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I. and Flavell, R.A. (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311, 847–851.
- [33] Chen, M., Won, D.J., Krajewski, S. and Gottlieb, R.A. (2002) Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* 277, 29181–29186.
- [34] Hoglinger, G.U., Breunig, J.J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Boutillier, A.L., Degregori, J., Oertel, W.H., Rakic, P., Hirsch, E.C. and Hunot, S. (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3585–3590.
- [35] van Empel, V.P., Bertrand, A.T., van der Nagel, R., Kostin, S., Doevendans, P.A., Crijns, H.J., de Wit, E., Sluiter, W., Ackerman, S.L. and De Windt, L.J. (2005) Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ. Res.* 96, 92–101.
- [36] Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T. and Ackerman, S.L. (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367–374.
- [37] Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin Jr., W.G., Livingston, D.M., Orkin, S.H. and Greenberg, M.E. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549–561.
- [38] DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7245–7250.
- [39] Garcia, I., Murga, M., Vicario, A., Field, S.J. and Zubiaga, A.M. (2000) A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ.* 11, 91–98.
- [40] Lazzarini Denchi, E. and Helin, K. (2005) E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep.* 6, 661–668.