



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHAZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

BCL2-related ovarian killer (BOK)
proteinak heriotza celular
programatuan eta mitokondrioen
morfologiaren eraldaketan parte
hartzen du

*I. Bustillo-Zabalbeitia, H. Flores,
O. Landeta, G. Basañez
eta O. Terrones*

438-444 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.60>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



BCL2-related ovarian killer (BOK) proteinak heriotza zelular programatua eta mitokondrioen morfologiaren eraldaketan parte hartzen du

Bustillo-Zabalbeitia I, Flores H, Landeta O, Basañez G* eta Terrones O*

Biofisika Unitatea (CSIC-UPV/EHU) eta Biokimika eta Biologia Molekularra Saila (EHU).P.O.Box 644, 48080 Bilbao

**Lanaren zuzendaritzan ekarpen berdina*

Kontakturako e-posta: Bustillo-Zabalbeitia I (itsasne.bustillo@ehu.es); Terrones O (oihana.terrones@ehu.es)

Laburpena

BCL2 familiako proteinak heriotz zelular programatua (apoptosia) erregulatzen duten osagai zelular nagusiak dira. BCL2 familiako proteinak bi taldetan bana daitezke funtzioaren arabera: kide pro-apoptotikoak eta kide anti-apoptotikoak. Nahiz eta BOK orain dela ia bi hamarkada aurkitu zen, BCL2 familiako kideen arteko ezezagunenetako bat da. Kide pro-apoptotikoekin (BAX/BAK) zenbait antzekotasun erakusten dituzenez, proteina pro-apoptotikoekin funtzionalki eta mekanistikoki errendundantea dela onartu izan da. Hala ere, uste hori zehazki egiaztatzeaz dago. Lan honetan, BOKek BAX/BAKekin ezaugarri komunak elkarbanatzeaz gain, desberdintasun garrantzitsuak dituela adierazten duten zenbait ebidentzia erakusten ditugu.

Hitz gakoak: Apoptosia, BCL2 familiako proteinak, mitokondrioen dinamika, minbizia

Abstract

BCL2 family proteins are the main regulators of program cell death (apoptosis). Depending on their function, BCL2 proteins can be divided in two main groups: the pro-apoptotic members and the anti-apoptotic members. Although BOK was identified almost two decades ago, it remains as one of the least understood BCL2 family members. Because BOK present certain similarities with pro-apoptotic proteins (BAX/BAK), it has been often been assumed that BOK is functionally and mechanistically redundant with BAX/BAK. However, this assumption remains to be explicitly proven. Here, we present distinct lines of evidence indicating that the cellular behaviour of BOK shares some common features but also important differences with BAX/BAK.

Keywords: Apoptosis, BCL2 family proteins, mitochondrial dynamics, cancer

1. Sarrera eta motibazioa

Mitokondrioak zelula eukariotikotan dauden organuluak dira. 1840. urtean deskribatu ziren lehenengo aldiz, nahiz eta *mitokondria* izena 1894rarte eman ez zitzaion. Berrogeita zortzi urte beranduago, 1946ean, arnasketa zelularra mitokondrioetan gertatzen zela frogatu zen, eta 1952. urtean mitokondrioetako bereizmen handiko lehenengo irudiak lortu ziren, mitokondrioak bi mintz desberdin dituela ondorioztatuz. Azken hamarkadetan mitokondrioaren inguruko ikerketak berpizte bat izan du bi aurkikuntza garrantzitsu direla eta. Batetik, mitokondriak etengabe fusionatu eta fisionatzen den sare dinamiko bat osatzen dutela behatu da, prozesu hau zelulen funtzionamendu egokirako oso garrantzitsua izanik. Mitokondrioen dinamika, dinamina-moduko GTPasak erregulatzen dute batik bat, eta hauen artean, mitokondrioen fisioan garrantzi handiena duena DRP1 deritzana da. Bestetik, mitokondrioek apoptosian paper garrantzitsua jokatzen dutela ere aurkitu da. Apoptosia, animalia zelula orok duen erahilketa prozesu kontrolatua da, zeinak enbrioaren garapenarako, erantzun inmunerako edo infekzio-agenteen aurkako babeserako berebiziko garrantzia duen. Apoptosiaren erregulazioan akatsek arazo larriak ekar ditzakete, hala nola, minbizia edo endekapenezko gaixotasunen sorrera.

Ugaztunetan, apoptosia erregulatzen duten proteina nagusiak, BCL2 familiako proteinak dira. Proteina hauen funtzioa mitokondrioko kanpo mintzaren (MKM) iragazkortasuna (MKMI) erregulatzeko da. BCL2 familiako proteinak bi taldetan sailkatu daitezke betetzen duten funtzioaren arabera: kide pro-apoptotikoak eta kide anti-apoptotikoak (Czabotar et al., 2014). BCL2 proteinen hasierako azterketek,

kideen artean sekuentzia homologia duten zenbait guneen identifikazioa ekarri zuten, BCL2 homologia (BH) domeinuak izendatu zirenak. Irizpide honen arabera, BCL2 familiako proteina pro-apoptotikoak bi azpitaldetan bana daitezke: BH3 domeinua soilik duten BID edo BIM bezalako kideak eta BH1, BH2, eta BH3 domeinuak dituzten BAK, BAX eta BOK bezalako kideak. Dena den, BOKen BH domeinuak BAX eta BAKen domeinuekin alderatzean desberdintasun nabariak daudela erakutsi da berriki. Gainera, badirudi BOK genearen jatorri ebolutiboa ez dela BAX/BAK geneenaren berdina (Aouacheria et al., 2013). Nahiz eta BAX eta BAKen mekanismo molekularren azterketa sakonak burutu diren, bi proteinek mekanismo pro-apoptotiko oso antzekoa dutela erakutsiz, oso gutxi dakigu BOKen funtzio eta mekanismo molekularriari buruz.

Egindako azterketetan oinarrituz, gaur egun badakigu baldintza osasuntsuetan BAX eta BAK proteinak era ez aktibo batean aurkitzen direla. Apoptosia eragiterakoan, BH3-domeinu bakarreko proteinek eta mitokondriako lipido espezifikoei BAX eta BAK aktibatzen dituzte MKMI eragiteko, c zitokromoaren (cyt c) askapena baimenduko duten poro proteolipidikoak eratuz (Landeta et al., 2011; Terrones et al., 2004). Nahiz eta sekuentzia, egitura eta funtzio oso antzekoak dituzten, BAX eta BAK proteinen zelula barneko kokapena ez da berdina. Baldintza osasuntsuetan, BAX nagusiki zitosolean eta BAK MKMean kokatzen dira, bi proteinen frakzio txiki bat Erretikulu Endoplasmatikoan (EE) eta Golgi aparatuan ere aurkitu daitekeelarik (Dumitru et al., 2012; Klee et al., 2009; Walensky, 2012; Wang et al., 2011). Apoptosian zehar BAX MKMan pilatzen dela argi dago. BOK proteina, bestalde, MKMan bezain ugaria izan daiteke EEan eta Golgi aparatuan, nukleoan ere aurkitu daitekeelarik (Echeverry et al., 2013); hala ere, organulu hauetan BOKen funtzioa zehazki zein den ez da oraindik ondo ezagutzen.

Duela hamarkada bat baino gehiago, apoptosian zehar BCL2 familiako kideek erregulatzen duten MKMI prozesuarekin batera, sare mitokondriala fisionatzen zela ikusi zen (Desagher eta Martinou, 2000; Frank et al., 2001). Nahiz eta oraindik ez den guztiz argitu mitokondrioen fisioak MKMI prozesuan paper aktiboa jokatzeko duen ala ez, DRP1en galerak c zitokromoaren askapena eta apoptosia atzeratzen dituela behatu izan da (Brooks et al., 2007; Frank et al., 2001). Fenomeno hau azaltzeko, bateraezinak ez diren bi azalpen desberdin proposatu dira: (i) DRP1ek eragindako mitokondriako mintzaren egitura aldaketak zuzenean MKMI faboratzen du (Youle & Karbowski, 2005), edota (ii) DRP1ek BAXen oligomerizazioa eragiten du, MKMI zeharka faboratuz (Montessuit et al., 2010). Honetaz gain, deigarria da egoera ez apoptotikoan, BAX eta BAKek mitokondrioen fusioan ere parte hartzen dutela. Dena den, BAX eta BAKen kasuan ez bezala, ezezaguna da BOKen funtzioaren eta mitokondrioen dinamikaren artean konexiorik ba ote dagoen.

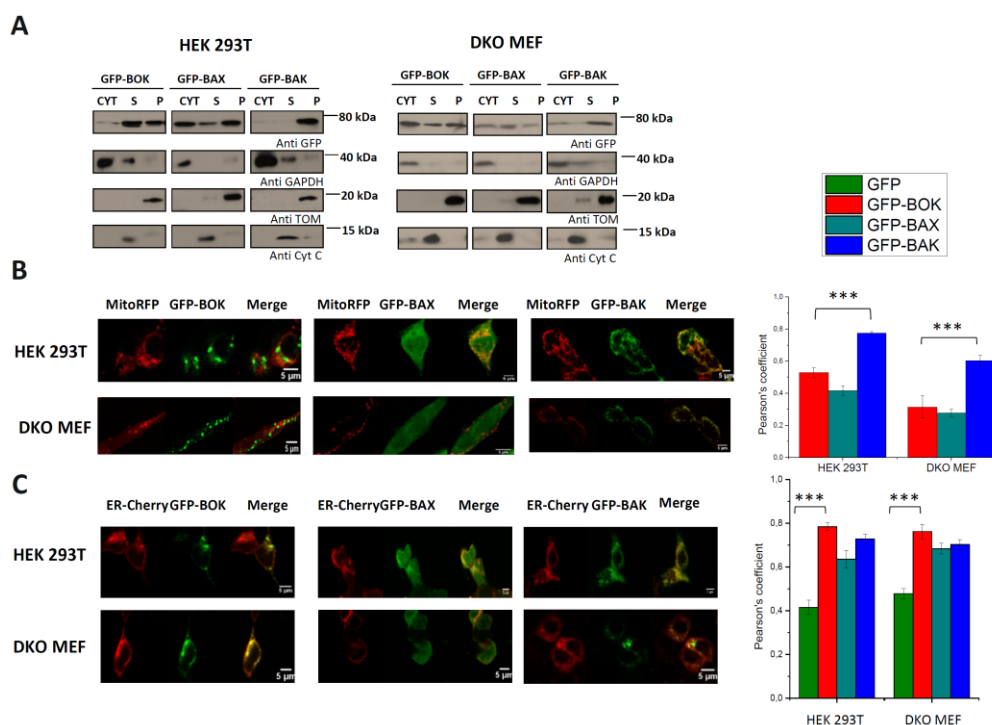
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

BCL2 familiako proteinak MKMan kokatzen dira apoptosia erregulatzeko. Proteina hauek betetzen duten funtzioan ematen diren akatsek arazo larriak ekar ditzakete, hala nola, minbizia edo endekapenezko gaixotasunen sorrera. Arrazoi hau dela eta, ikerketa sakonak burutu dira proteina hauek maila molekularrean nola funtzionatzen duten ezagutu ahal izateko. Hala ere, sistemaren konplexutasuna dela eta, proteina hauetako askoren mekanismo zehatza ez da oraindik ondo ezagutzen; horien artean aurkitzen da lan honen aztergai den BOK proteina. Gure lanaren helburu nagusia, BCL2 familiako kide den BOK proteinaren mekanismo molekularren ezagutza aurrerapausuak ematea da. Zehazki, (i) BOK proteinak ingurune zelularrean duen kokapena aztertu eta (ii) zelulan betetzen d(it)uen funtzio(ar)en inguruko ezagutza zehatzagoa lortzea.

3. Ikerketaren muina

BCL2 familiako proteina desberdinen zelula barneko kokapena desberdina izan daiteke, eta aldatu egin daiteke zelularen egoera fisiologikoaren arabera. BOKen kasurako, ikerketa desberdinek zelula barneko kokapen desberdina proposatu dute; zitosolikoa, mitokondriala, EE, Golgi aparatua eta baita nukleoa ere (Brown et al., 2004; Echeverry et al., 2013; Gao et al., 2005; Ray et al., 2010; Yakovlev et al., 2004). BOKen kokapen zehatza ezagutu nahian, BOK, BAX eta BAKen zelula barneko kokapenak konparatzea erabaki genuen. Horretarako, BOK, BAK eta BAX cDNAk pEGFP-C2 bektorean azpiklonatu genituen. Ondoren, GFP isatsa duten BOK, BAX eta BAK, HEK 293T zeluletan gainadierazi ziren transfekzio iragankorraren bidez, eta jarraian frakzionamendu azpizelularra burutu zen. Analisi honek, zelula osasuntsuetan gainadierazitako GFP-BOKen gehiengo zelula barneko mintzei batuta aurkitzen dela

erakutsi zuen (S eta P frakzioak, 1A irudia). GFP-BOK mintz azpizelularren bigerua lipidikoan txertatuta ote dagoen jakiteko, laginak sodio karbonatoarekin tratatu genituen. Mintz proteina periferikoak, bigerua lipidikoan txertatuta ez daudenak, mintzetatik kanporatu daitezke karbonato alkalinoa erabiliz, baina mintz proteina integralak ordea, ez. Azterketa honen arabera, GFP-BOK proteinak banaketa nahasia aurkeztu zuen, sodio karbonato tratamenduaren osteko gainjalkinan (“S”, mintz proteina periferikoak adierazten dituen) eta baita sodio karbonato tratamenduaren osteko jalkinan kokatuz (“P”, mintz proteina integralak adierazten dituen). Aldiz, GFP-BAK, “P” frakzioan soilik agertu zen, aurreko ikerketek proposatutako bere mintz-integral naturarekin bat datorrena hain zuzen ere. Echeverry *eta* lank. (Ke et al., 2012) berriki deskribatu dute BOKek eragindako apoptosis BAX eta BAK proteinen menpekoea dela. Ondorioz, BAX/BAKek BOK proteinaren zelula barneko kokapena zehazten duten aztertu genuen BAX eta BAK adierazten ez duten arratoien enbrioien fibroblastoetan (DKO MEF). 1A irudian erakusten den bezala, gainadierazitako GFP-BOKaren frakzio handi bat ez zen DKO MEF zeluletako mintzetan kokatu, zelula hauen zitosolean (“Cyt”) baizik.

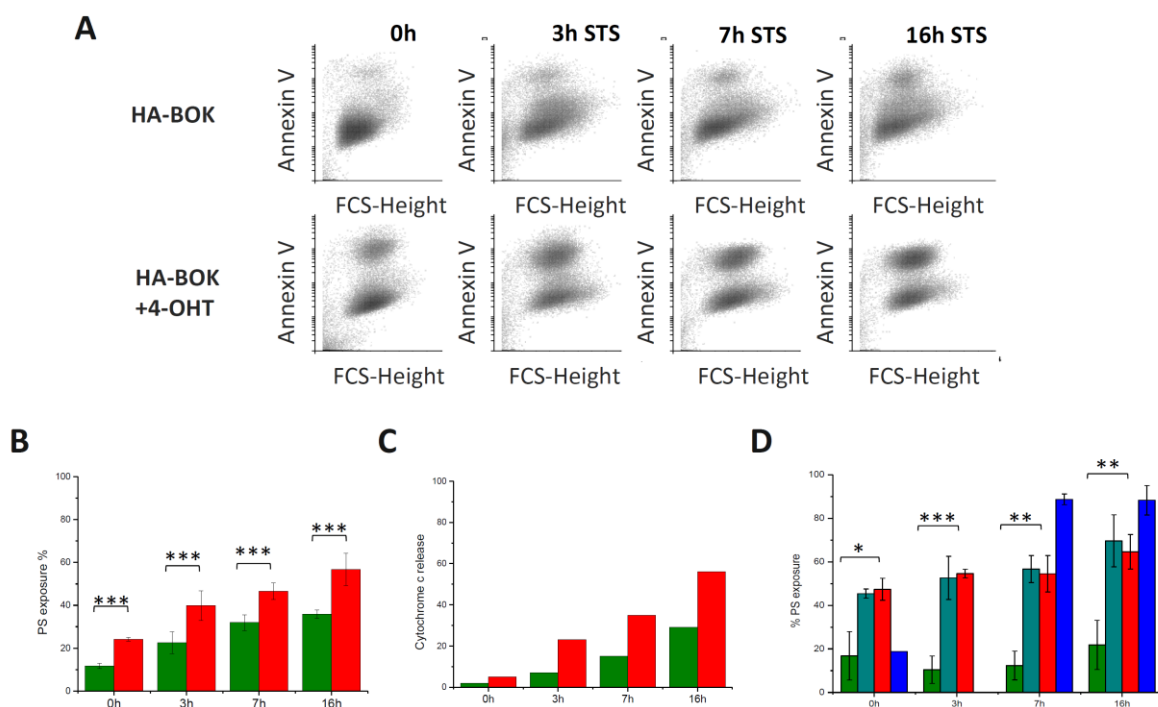


1 Irudia. BOKen zelula barneko kokapena. **A)** Transfekzio iragankorraren bidez gainadierazitako GFP-BOK, GFP-BAX eta GFP-BAK-en zelula barneko kokapena, frakzionamendu azpizelular baten bidez aztertua. Cyt: Frakzio zitosolikoa, S: Sodio karbonato tratamenduaren osteko gainjalkina (Mintz proteina periferikoak) eta P: sodio karbonato tratamenduaren osteko jalkina (Mintz proteina integralak). **B)** eta **C)** GFP-BOK, GFP-BAX edo GFP-BAK gainadierazten duten HEK 293T eta DKO MEF zelulen mikroskopia konfokaleko argazkiak. Zelulak mitoRFP-rekin (B) edo EE-Cherryrekin (C) kotransfektatu ziren. Kolokalizazio maila Pearson koefizientearen bidez neurtu zen. Batezbesteko balioak $\pm$ Errore Estandarra hiru esperimentu idenpendenteen emaitzak kontuan hartuz lortu ziren. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

BOKen zelula barneko kokapena sakonkiago aztertzeko, fluoreszentziazko mikroskopia konfokala erabili genuen. HEK 293T eta DKO MEF zelulak GFP-BOK, GFP-BAK eta GFP-BAX plasmidoekin transfektatu ziren, mitokondrioarekiko espezifiko den mito-RFP markatzailearekin edo EE-rekiko espezifiko den EE-Cherry markatzailearekin batera. 1. Irudiko B atalean erakusten denez, baldintza osasuntsuetan, GFP-BOK/mitoRFP partzialki kolokalizatzen dute HEK 293T zeluletan, kolokalizazio maila baxuagoa delarik DKO MEF zeluletan, kasu honetan proteinaren agregatu ez-mitokondrial handiak ikusten direlarik. GFP-BOKek baldintza osasuntsuetan mitokondrioan duen kokapen maila kuantifikatzeko “Pearson’s correlation” analisia burutu zen “Rr” deritzan kolokalizazio faktorea kalkulatu. Azterketa honen arabera, GFP-BOK eta mito-RFP, partzialki kolokalizatzen dute HEK 293T zeluletan ($Rr = 0.53 \pm 0.03$) eta maila baxuago batean DKO MEF zeluletan ($Rr = 0.31 \pm 0.06$) (1B

Irudia). Aztertutako bi lerro zelularretan GFP-BAX/mito-RFP kolokalizazio maila GFP-BOK/mito-RFPrena baino baxuagoa da GFP-BAK/mito-RFPrena handiagoa delarik. Bestalde, EE-Cherryrekin kotransfektatzerakoan, GFP-BOK, GFP-BAX, eta GFP-BAKek antzeko kolokalizazio maila erakutsi zuten EEko markatzailearekiko (1C Irudia). Gainera, pearson korrelazio analisiek adierazten dute EEra asoziatutako GFP-BOK kopurua HEK eta DKO MEF zeluletan antzekoa zela, BAX edota BAKek BOKen EE kokapena modulatzeko ez dutela iradokituz.

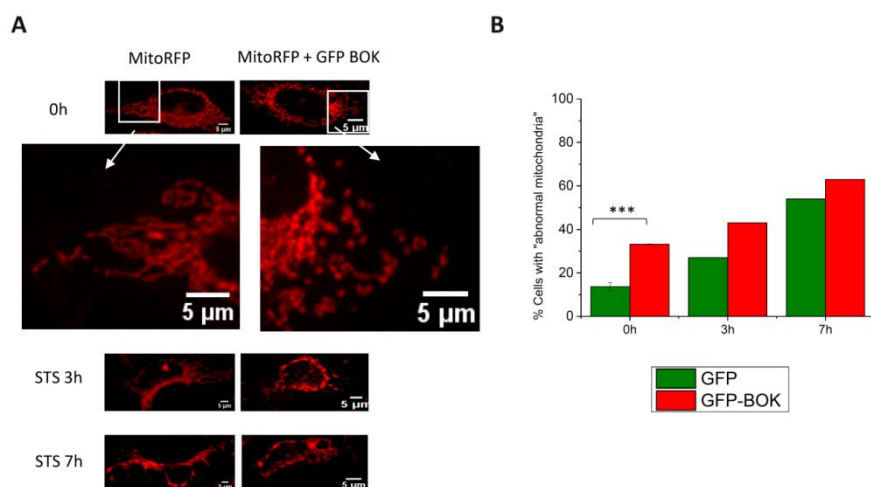
Jarraian, BOKek apoptosia eragiteko gaitasuna ote zuen aztertu genuen. Transfektzio iragankorrak, aztergai den proteinaren adierazpen maila oso altu, eta beraz ez fisiologikoak, eragiten ditu, askotan bideragarritasun zelularra kaltetuz. Hau dela eta, Hydroxytamoxifen (4-OHT) bidez HA-BOK modu kontrolatu batean adierazi dezaketen zelula induzigarriak ekoiztu genituen. Ondoren, 4-OHTrekin 24 orduz tratatutako HeLa zelula induzigarriak estaurosporina (STS) agente apoptotikoarekin tratatu, eta 3, 7 eta 16 orduz inkubatu ziren. 2B eta 2C irudietan agertzen den bezala, HA-BOKen adierazpen hutsak apoptosiaren indikatzaile diren fosfatidilserinaren (PS) esposaketaren eta c zitokromoaren askapena eragiten du ("HA BOK, 0h" deitutako laginak, 2B eta 2C irudietan). Gainera, HA-BOKen gainadierazpen induzituak STSrekin tratatutako HeLa zelulak apoptosira sentsibilizatzen ditu (2A, 2B eta 2C irudiak).



2.Irudia. BOKen gainadierazpenak apoptosia eragiten du. A) eta B) HeLa zelula induzigarrietan HA-BOK adierazpenak eragiten duen PS esposaketa, Annexin-V kitarekin FACS bidez aztertua. 0h-k adierazten du zelula hauek ez direla STSrekin tratatu. A) Datu gordinak agertzen dira. B) Grafikoa hiru esperimentu independenteen batez bestekoa $\pm$ Errore Estandarra erakusten da. C) HeLa zelula induzigarrietan HA-BOK adierazpenak eragindako c zitokromoaren askapena, immunotindaketa eta mikroskopia konfokal bidez aztertua. D) DKO MEF zeluletan GFP-BOKen edo GFPren gainadierazpen iragankorrak eragiten duen PS esposaketa. Grafikoa hiru esperimentu independenteen batez bestekoa $\pm$ Errore Estandarra erakusten da. $p < 0.01$, $***p < 0.001$.**

Ondoren, BOKek eragindako apoptosia BAX eta BAKen menpekota den aztertzea erabaki genuen. 2D irudiak erakusten duen bezala, GFP-BOKen gainadierazpen hutsak DKO MEF zelulen apoptosia eragiten du, PS esposaketa eta cyt c askapenarekin ikusi daitekeen moduan ("GFP-BOK, 0h" deituriko laginak 2D irudian). Gainera, GFP-BOKekin transfektatutako DKO MEF zelulak STSrekin tratatuz PS esposaketa eta cyt c askapena gehiago areagotzen da.

BCL2 familiako proteina batzuek, BAX eta BAK barne, dinamika mitokondrialean parte hartu dezaketenez, jarraian BOKEk morfologia mitokondrialean eraginik eduki lezakeen aztertzea erabaki genuen. 3. irudian erakusten den bezala, GFP-BOKEN gainadierazpenak HeLa zeluletako sare mitokondrialaren itxura orokorra aldatzen du (3A irudia).



3 Irudia. GFP-BOKEN gainadierazpenak HeLa zelulen mitokondrioen morfologia aldatzen du. A) GFP-BOK plasmidoarekin iragankorki transfektatutako HeLa zeluletan mitokondrioen morfologia aldaketak behatu daitezke, GFP plasmido "hutsa" rekin transfektatutako zelulak sare mitokondrial normala mantentzen dutelarik. Zehazki, GFP-BOKEkin transfektatutako zeluletan, mitokondrioen pilaketak ikusi daitezke nukleo inguruan eta baita mitokondrio fisionatuak ere. **B)** Ezohizko morfologia duten mitokondrioak (nukleo inguruan pilatutako mitokondrioak + fisionatutako mitokondrioak) dituzten zelulen portzentaia adierazten duen adierazpen grafikoa.

4. Ondorioak

BOKEN zelula barneko banaketari dagokionez, gure emaitzak egoera osasuntsu (ez apoptotiko) batean, BOK mitokondrioetan eta EEan kokatzen dela erakusten dute. BOKEN kokapen hau, BAXek zelula osasuntsuetan duen kokapen zitotosolikoaren desberdina da, baina BAKek zelula osasuntsuetan duen kokapena gogorarazten du. Interesgarria da, BAX eta BAKen absentsian, BOKEN kokapen mitokondrial partzialki galdu egiten dela, BOKEN EEko kokapena aldatzen ez den bitartean. Nahiz eta fenomeno honen arrazoia zehazteke egon, zenbait aukera bistaratu daitezke. Aukera bat da, MKMean kokatzen den BAK, BOKEN hartzaile bezala jokatzeko, berriki BAXen kasurako erakutsi den moduan (Ma et al., 2014). Beste aukera bat da, BAX/BAK gabeziak BOK MKMera bideratzen edota batzen parte hartu lezaketan mitokondrioko proteina edo lipidoengan eragin kaltegarria izatea. Bestalde, BOKEN EEko kokapena BAX/BAK menpekoa ez dela aurkitzeak iradokitzen du EEan eta mitokondrioan kokatutako BOKEk organulu bakoitzera bideratzeko behar desberdinak dituela. Azken ikerketekin bat eginez, BOKEN gainadierazpen hutsak zelularen bideragarritasunerako kaltegarria dela baieztatu dugu (Echeverry *eta* lank., 2013). Ez hori bakarrik, BOKEN gainadierazpenak zelulak apoptosis eragiteko estimulu klasikoak den STSari sentsibilizatzen dituela ere ikusi dugu. Gure datuak kontutan hartuta hurrengo proposatu dezakegu: (i) BOKEN gainadierazpenak apoptosis eragiten duela BAX/BAK beharra ez duen mekanismo baten bidez, eta (ii) BOKEN kokapen mitokondrialaren galerak ez du BOKEN gainadierazpenak eragindako apoptosis inhibitzen. Gure emaitzetatik eratorritzen den galdera nagusia hurrengo da: Nola eragin dezake MKM edo EEan kokatuta dagoen BOK proteinak c zitokromoaren askapena BAX/BAK modu independente batean? Baliteke BOKEk MKMetan poro proteolipidiko handiak eratzeke gaitasun intrintsekoa izatea, BAXek eta BAKek bezala. Beste aukera bat, EEan kokatutako BOKEk bertako kaltzioaren askapena eragitea da, kaltzioaren metaketa mitokondrioan eraginez, mitokondrioen eztanda eta c zitokromoaren askapena ekarriko lukeena. Lan honetan gainera, BOKEN gainadierazpenak morfologia mitokondrialean anormaltasunak eragiten dituela erakutsi dugu. Ezin izan dugu frogatu BOKEk mitokondrioan eragindako aldaketa

morfologikoak zuzenki erlazionatuak dauden ala ez BOKEk apoptosia eragiteko duen ahalmenarekin. Interesgarria iruditzen zaigu hala ere, BOK, EE eta Golgi aparatuen fisioa eragiten duela proposatu izan dela, nahiz eta oraindik BOKen mintz-aktibitate hauen eta BOKEk eragindako apoptosiaren arteko loturarik dagoen argitzeke geratzen den (Echeverry et al., 2013).

5. Etorkizunerako planteatzan den norabidea

Oso informazio gutxi dago eskuragarri BOKen funtzio eta akzio mekanismoari buruz, hori dela eta, guk burututako ikerketa honek emaitza garrantzitsu batzuk eta erantzutez geratzen diren galdera asko sortu ditu. Azken hauen artean, BOKEk mitokondrioan kokatzeko BAXen edo BAKen beharra duen jakitea da, ez soilik egoera osasuntsuan baizik eta baita apoptosian ere. Funtsezko beste galdera bat da ea MKMean edo EEan kokatutako BOK proteinak zitokromo c-aren askapena nola eragiten duen. BOKEk mitokondrioen morfologia aldatzeko erabilitako mekanismoa zein den, eta aldaketa hauek zelularen bideragarritasunean efekturik ote duten guztiz argitzear daude oraindik ere.

6. Erreferentziak

- Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., & Hardwick, J. M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends in Cell Biology*, 23(3), 103–11. doi:10.1016/j.tcb.2012.10.010
- Bartholomeusz, G., Wu, Y., Seyed, M. A., Xia, W., Kwong, K. Y., Hortobagyi, G., & Hung, M. C. (2006). Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 73–83. doi:10.1002/mc.20156
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., ... Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), 11649–54. doi:10.1073/pnas.0703976104
- Brown, C. Y., Bowers, S. J., Loring, G., Heberden, C., Lee, R.-M., & Neiman, P. E. (2004). Role of Mtd/Bok in normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(6), 619–34. doi:10.1016/j.dci.2003.09.017
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63.
- Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*. doi:10.1016/S0962-8924(00)01803-1
- Dumitru, R., Gama, V., Fagan, B. M., Bower, J. J., Swahari, V., Pevny, L. H., & Deshmukh, M. (2012). Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Molecular Cell*, 46(5), 573–83. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.002
- Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, a, Simon, H. U., & Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death and Differentiation*, 20(6), 785–99. doi:10.1038/cdd.2013.10
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., ... Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell*, 1(4), 515–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703942>
- Gao, S., Fu, W., Dürrenberger, M., De Geyter, C., & Zhang, H. (2005). Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(9), 1015–24. doi:10.1007/s00018-005-4543-3

- Ke, F., Voss, a, Kerr, J. B., O'Reilly, L. a, Tai, L., Echeverry, N., ... Kaufmann, T. (2012). BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death and Differentiation*, 19(6), 915–25. doi:10.1038/cdd.2011.210
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., & Pimentel-Muñoz, F. X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *The EMBO Journal*, 28(12), 1757–68. doi:10.1038/emboj.2009.90
- Landeta, O., Landajuela, A., Gil, D., Taneva, S., Di Primo, C., Sot, B., ... Basañez, G. (2011). Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8213–30. doi:10.1074/jbc.M110.165852
- Ma, S. B., Nguyen, T. N., Tan, I., Ninnis, R., Iyer, S., Stroud, D. A., ... Dewson, G. (2014). Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death : a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function, 1925–1935. doi:10.1038/cdd.2014.119
- Montessuit, S., Somasekharan, S. P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., ... Martinou, J.-C. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell*, 142(6), 889–901. doi:10.1016/j.cell.2010.08.017
- Ray, J. E., Garcia, J., Jurisicova, a, & Caniggia, I. (2010). Mtd/Bok takes a swing: proapoptotic Mtd/Bok regulates trophoblast cell proliferation during human placental development and in preeclampsia. *Cell Death and Differentiation*, 17(5), 846–59. doi:10.1038/cdd.2009.167
- Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H.-G., Liu, J., Lee, R. M., ... Basañez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30081–91. doi:10.1074/jbc.M313420200
- Walensky, L. D. (2012). Stemming danger with Golgified BAX. *Molecular Cell*, 46(5), 554–6. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.034
- Wang, X., Olberding, K. E., White, C., & Li, C. (2011). Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18, 38–47. doi:10.1038/cdd.2010.68
- Yakovlev, A. G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., & Faden, A. I. (2004). BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28367–74. doi:10.1074/jbc.M313526200
- Youle, R. J., & Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), 657–63. doi:10.1038/nrm1697

7. Eskerrak eta oharrak

HA-BOK adierazten duten zelula induzigarriak Genevako Unibertsitatean egindako egonaldi batean ekoiztu ziren Prof. Martinouren zuzendaritzapean.

Ikerketa hau hurrego proiektuekin finantzatua izan da: Eusko Jaurlaritza, IT838-13; EHU, EHU-1374; eta Espainiar Gobernuko Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren BFU 2011-28566.

Itsasne Bustillo-Zabalbeitia Eusko Jaurlaritzako doktoregutzarako diru-laguntza baten onuraduna izan da.