

## OLIGOMERIZACIÓN DEL VDAC-1: APOPTOSIS MITOCONDRIAL

### OLIGOMERIZATION OF VDAC-1: MITOCHONDRIAL APOPTOSIS

**Roxana Mamani Ancassi<sup>1</sup>**  
**Telmo Agustín Mejía García<sup>2</sup>**

1. Doctora en Neuroinmunología. Investigadora del Centro de Investigación en Neurobiología Celular CINC-ROXTEL.

2. Doctor en Neuroinmunología. Investigador Principal y Jefe del Centro de Investigación en Neurobiología Celular. CINC-ROXTELAQP.

#### RESUMEN

En los últimos años, el estudio de la neurodegeneración ha sido direccionado para el entendimiento de las disfunciones mitocondriales. Mutaciones probables en proteínas de la mitocondria alterarían la producción de ATP, la formación de radicales libres, la pérdida de la homeostasis de calcio en la célula, etc. Las degeneraciones mitocondriales desempeñarían un papel esencial en la génesis de las enfermedades neurodegenerativas como: Epilepsia, Parkinson, Huntington, Alzheimer. Luego, en sistemas donde la regeneración celular no se realiza tal como lo hace el sistema nervioso, es posible acumular mutaciones somáticas mitocondriales. En la mitocondria, varios metabolitos e iones son intercambiados con el citosol a través de la membrana mitocondrial externa (MME), exhibiendo permeabilidad selectiva principalmente por la presencia de porinas mitocondriales conocidas como canales aniónicos dependientes de voltaje (VDACs). Entonces, el VDAC desempeñaría un papel importante en la supervivencia y muerte celular. Aunque autónoma, la mitocondria constituye un modelo experimental bastante útil para el estudio del sistema nervioso en alteraciones propias de entrada y salida de metabolitos de matriz, enfermedades neurodegenerativas y mecanismos de unión de proteínas tanto cuanto en la membrana mitocondrial externa, interna y la matriz mitocondrial.

**Palabras clave:** ATP, Degeneración mitocondrial, oligomerización, P2X7, VDAC-1.

#### ABSTRACT

In recent years, the study of neurodegeneration has been addressed for the understanding of mitochondrial dysfunctions. Probable mutations in proteins of the mitochondria would alter the production of ATP, formation of free radicals, loss of calcium homeostasis in the cell, etc. Mitochondrial degenerations would play an essential role in the genesis of neurodegenerative diseases such as: Epilepsy, Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's. Then in systems where cell regeneration is not performed such as the nervous system, it is possible to accumulate mitochondrial somatic mutations. In the mitochondria, several metabolites and ions are exchanged with the cytosol through the outer mitochondrial membrane (MME), exhibiting selective permeability mainly due to the presence of mitochondrial porins known as voltage-dependent anionic channels (VDACs). Then, VDAC would play an important role in cell survival and death.

Although the mitochondrion is autonomous, it is a very useful experimental model for the study of the nervous system in its own alterations in the input and output of matrix metabolites, neurodegenerative diseases and protein binding mechanisms, both in the outer mitochondrial membrane, the internal membrane and the mitochondrial matrix.

**Key words:** ATP, mitochondrial degeneration, VDAC-1, oligomerization, P2X7.

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central, altamente dependiente de un metabolismo oxidativo, se encuentra más severamente expuesto a desórdenes mitocondriales. La plasticidad sináptica, la maduración, la proliferación, el crecimiento y los efectos de supervivencia se encuentran orquestados por la mitocondria y estos son extremadamente relevantes en las neuronas debido a la alta demanda energética requerida.

La mitocondria es una organela esencial, cuya función no solo soporta el almacenamiento de energía por la vía glicolítica de adenosina trifosfato (ATP), más también la producción de oxígeno molecular propio del intercambio de los metabolitos necesarios para la correcta comunicación nerviosa, así como la mantención en la integridad y función neuronal. Varios metabolitos e iones son intercambiados con el citosol a través de la membrana mitocondrial externa (MME), exhibiendo permeabilidad selectiva, principalmente, por la presencia de porinas mitocondriales conocidas como Canales Aniónicos Dependientes de Voltaje (VDACs)<sup>(1)</sup>.

El VDAC desempeña un papel importante en la supervivencia y muerte celular. Se considera que la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria asociada a la apoptosis mediaría el influjo de  $Ca^{2+}$  a través del VDAC-1<sup>(2)</sup>. Además de esto, trabajos recientes describen que el VDAC-1 interactuaría con el receptor de IP3 (tipo 3) del retículo endoplasmático de  $Ca^{2+}$  para la transferencia hacia las mitocondrias<sup>(3)</sup>. Recientemente, fue mostrado que la liberación de citocromo c de la mitocondria sería a través de un poro central formado por una estructura oligomérica del VDAC-1 creando una vía suficiente para el pasaje de esta proteína. Luego, el VDAC-1 interactuaría con diversas proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, enzimas metabólicas, tales como proteínas del citoesqueleto hexoquinasa I/II (HK-I/HK-II) (4). Hemachandra Reddy<sup>(5)</sup>, en un artículo de revisión, muestra que el VDAC-1 actuaría como un blanco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, Manczak, y cols.<sup>(6)</sup> mostraron que la expresión reducida del VDAC-1 podría ayudar en la actividad sináptica inhibiendo la activación de genes de la enfermedad de Alzheimer. Todos estos hallazgos demostrarían que esta proteína-poro podría tener una importancia mayor en la regulación de la muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas.

Aunque autónoma, la mitocondria constituye un modelo experimental bastante útil para el estudio del sistema nervioso en alteraciones propias de entrada y salida de metabolitos de la matriz, así como de las enfermedades neurodegenerativas y mecanismos de unión de proteínas, tanto cuanto en la membrana mitocondrial externa, interna y la matriz mitocondrial.

## CANAL ANIÓNICO DEPENDIENTE DE VOLTAJE

La membrana mitocondrial externa controla el pasaje de iones y metabolitos para el espacio intermembranal, donde el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) sería la proteína más abundante en esta membrana, la cual corresponde a más del 50% del total de proteínas de la membrana mitocondrial externa<sup>(7)</sup>. El VDAC está involucrado en una amplia gama de procesos, como el pasaje de ATP al exterior de la mitocondria, liberación de aniones superóxido, así como en el proceso de apoptosis<sup>(8)</sup>. El VDAC-1 se puede encontrar en dímeros, trímeros, tetrámeros y estados oligoméricos mayores en proceso dinámico, incluyendo el VDAC-1 purificado de la mitocondria del hígado y cerebro.

El canal adopta una conformación abierta tanto en bajo potencial como en potencial de reposo, y una conformación cerrada en los potenciales por encima de 30-40 mV. El VDAC-1 facilita el intercambio de aniones y moléculas entre las mitocondrias y citosol regulada por las interacciones con otras proteínas y moléculas pequeñas<sup>(1)</sup>.

La proteína contiene aproximadamente 280 aminoácidos y forma un barril beta que atraviesa la membrana externa mitocondrial. El VDAC tiene una conformación espacial de un  $\beta$ -barril anfipático, compuesto por 16  $\beta$ -hojas. Además, en el  $\beta$ -barril se encuentra la secuencia de aminoácidos que componen una  $\alpha$ -hélice N-terminal<sup>(9)</sup>, la cual permitiría la fijación de la porina a la MME. Adicionalmente, se sabe que el  $\alpha$ -hélice N-terminal puede interactuar con otros componentes, tales como el citocromo c, Smac/Diablo y AIF, los cuales son importantes factores pró-apoptóticos. El  $\alpha$ -hélice N-terminal del VDAC es necesario para el establecimiento de la unión a Hexocinasa (HK)-VDAC; siendo, por tanto, esencial para las funciones de la porina (4). Varios residuos de lisina, así como de Glu-152, han sido relacionados como sensores especialmente importantes dentro de la proteína. El VDAC presenta un papel en la regulación de flujo metabólico a través de la membrana mitocondrial

externa, participando en el transporte de ATP, ADP, piruvato, malato, y otros metabolitos e/o enzimas de la vía metabólica.

En la apoptosis, el incremento de la permeabilidad de la membrana permitiría la liberación de factores apoptogénicos, entre estos el citocromo c. En tanto, el citocromo c en el citosol activa varias enzimas proteolíticas denominadas caspasas. Algunas investigaciones sugieren la oligomerización entre las subunidades individuales permitiendo la mayor apertura del poro a través del cual el citocromo c, podría atravesar. Luego, la liberación del citocromo c también se encontraría regulada por el reclutamiento de la familia de proteínas Bcl-2: Bax interactuando directamente con el VDAC para incrementar el tamaño del poro. En ese contexto, se sugiere al VDAC como blanco potencial para múltiples drogas terapéuticas.

### LA OLIGOMERIZACIÓN DEL VDAC-1

La oligomerización de VDAC-1 permite la liberación del citocromo c y la apoptosis subsecuente envolviendo proteínas clave de la vía mitocondrial, tales como Bak y Bax<sup>(10) (11) (12)</sup>. Después de la inducción de apoptosis, la Bax monomérica, citosólica o débilmente unida a la mitocondria, formaría un gran complejo oligomérico de 96 o 260 kDa<sup>(11)</sup>. Las formas oligoméricas de Bax son la base estructural del canal de conducción del citocromo c de la membrana mitocondrial externa<sup>(12)</sup>. La apoptosis por el TNF- $\alpha$  activa la caspasa-8, luego cliva Bid a tBid generando oligómeros de Bax y Bak y formando complejos de hasta 500 kDa<sup>(12)</sup>. Keinan y cols.<sup>(13)</sup>, demostraron que el TNF- $\alpha$  induciría la oligomerización del VDAC, lo que implicaría que el proceso también pueda permitir oligomerización del tBid mediada por el VDAC. De la misma forma, el tBid clivado interactuaría directamente con el VDAC. Por otro lado el As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induciría la formación del Bax y hetero- o homo-oligómeros del VDAC, seguidamente, el Bax y el VDAC podrían formar un gran poro permeable para el citocromo c<sup>(14)</sup>. La mediación del poro intraoligomérico para un oligómero del VDAC dependería del número de monómeros del VDAC que forman el poro. La estructura del poro de seis monómeros cilíndricos de VDAC-1 resultaría en un poro central con un diámetro de 4 nm formando, de este modo, un camino suficiente para el pasaje del citocromo c con un diámetro de 3.4 nm<sup>(15)</sup>.

El VDAC-1 oligomerizado, sería un mecanismo general para numerosos apoptógenos que actuarían a través de diferentes cascadas de iniciación. Se sabe que la

liberación del citocromo c, es iniciada y completada varios minutos antes de que la actividad de la caspasa 3/7 sea detectable<sup>(16)</sup>; de este modo, la caspasa-3 es activada señalización abajo del citocromo c liberado. En tanto, acontecimientos moleculares inducidos por apoptógenos, tales como: la estaurosporina (STS), la curcumina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, el etopósido, la cisplatina, el selenito o la radiación UV, serían transmitidos para la mitocondria, activando oligomerización del VDAC-1.

Fue demostrado que el VDAC cerrado podría llevar a la acidificación citosólica e hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial interna. Las hexoquinas ligadas a mitocondrias (mtHKs) están acopladas directamente al metabolismo para la fosforilación oxidativa a expensas de ATP intramitocondrial para, de esta forma, catalizar la conversión de glicosa en glicosa-6-fosfato<sup>(17)</sup>.

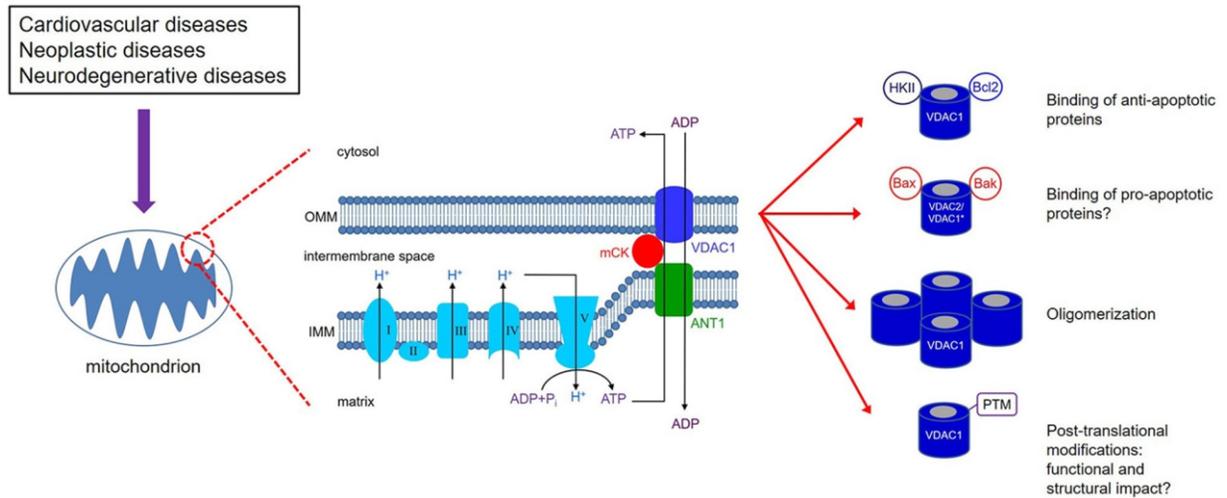
Revisando el mecanismo de apoptosis; una vez liberado el citoplasma a través del VDAC-1 oligomerizado y en presencia del ATP, el "citocromo c" se une al apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), potenciando su oligomerización y consecuentemente el reclutamiento/ativación de la pro-caspase-9. El complejo proteico que comprende el citocromo c, Apaf-1 y pro-caspase-9 es denominado "apoptosoma"<sup>(18) (19)</sup>. La inducción de esta vía es controlada por las proteínas de la familia Bcl-2<sup>(20)</sup>. Las proteínas pro-apoptóticas de esta familia son divididas en dos grupos distintos: IIa) proteínas con multidominios, las cuales contienen 3 dominios BH: Bax, Bak, e a Bok; y IIb) proteínas apenas con el dominio BH3 preservado: Bad, Bid, Bmf, Bik, Hrk, Noxa e Puma, las cuales se unen a las proteínas anti-apoptóticas promoviendo de esta forma la apoptosis. En esa ocurrencia, además de la liberación del citocromo c por VDAC-1, se asocia también la liberación de otras proteínas pro-apoptóticas mitocondriales localizadas en el espacio intermembranal como Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, Apoptotic inductor factor (AIF) y endonucleasa G (EndoG)<sup>(21)(22)</sup>.

Luego, la ruptura de la membrana mitocondrial externa a través de la apertura del mPTP permitiría la liberación del citocromo c de la mitocondria en el citoplasma e induciría, finalmente, la activación de la caspase-3<sup>(23)</sup>.

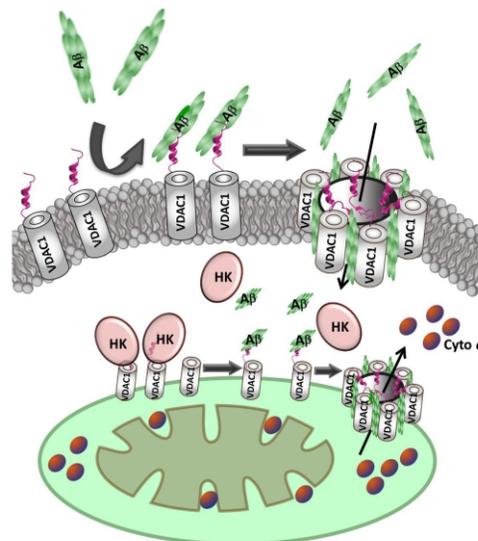
Finalmente, consideramos que para el caso de diversas neuropatologías, la activación de diversos receptores de muerte tales como P2X7 dependientes de la caspasa-3 como fue mostrado por Anccasi y cols.<sup>(24)</sup>,

podrían generar una vía en la activación y oligomerización de VDAC-1, sumado Keinan y cols.<sup>(13)</sup> demostraron que la apertura del mPTP vía activación del P2X7 refiere alteración mitocondrial. Por tanto,

VDAC-1, es una proteína poro relevante en la comprensión de diversas disfunciones mitocondriales asociadas con enfermedades neurodegenerativas activadas por receptores de muerte.



**Figura 1.** VDAC-1 es expresado sobre la membrana mitocondrial externa (MME). Juntamente con ANT-1 (translocador de nucleótidos de adenina-1) sobre la membrana mitocondrial interna (MMI) y la creatin kinase mitocondrial (mCK), el complejo VDAC-1-ANT-1-mCK regula el intercambio de ATP y ADP entre la mitocondria y el citosol. VDAC-1 funciona como un receptor para proteínas anti- y pro-apoptóticas y, consecuentemente, contribuye a la supervivencia y muerte celular.<sup>(25)</sup>



**Figura 2.** Modelo propuesto describiendo la interacción de VDAC-1 mediante muerte celular apoptótica mitocondrial. En la membrana plasmática, pl-VDAC-1 (amarillo) interactúa con oligómeros de Aβ vía dominio I N-terminal envolviendo motivo GXXXG, electrostático, cargas negativas en Aβ (en rojo y azul). Esta interacción resulta en la formación de un hetero-oligomero de pl-VDAC-1-Aβ, permitiendo Aβ entrar a la célula. Aβ citosólico interactúa con VDAC-1 mitocondrial en el dominio N-Ter permitiendo su subsiguiente oligomerización, y consecuente liberación de Citocromo c y finalmente muerte celular apoptótica (26).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Shoshan-Barmatz V., N. Keinan, S. Abu-Hamad, D. Tyomkin e L. Aram. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo, *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1281–1291. (2010).
- Gincel, D., Zaid, H. y V. Shoshan-Barmatz. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 358, 147–155 (2001).
- Krauskopf, A., Eriksson, O., Craigen, W. J., Forte, M. A. e P. Bernardi, Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757, 590–595. (2006).
- Pastorino J.G., Shulga N. e JB. Hoek. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277(9):7610–7618. (2002).
- Reddy P. Hemachandra. Is the mitochondrial outer membrane protein VDAC1 therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochimica et Biophysica Acta* 1832 (2013) 67–75 Review. (2013).
- Manczak, M., Sheiko T, Craigen WJ. e PH. Reddy. Reduced VDAC1 Protects Against Alzheimer's Disease, Mitochondria and Synaptic Deficiencies *Alzheimers Dis.* 2013 ; 37(4): 679–690. (2013).
- Mannella CA. Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J Struct Biol.* 121(2):207-18. (1998).
- Gonçalves, R.P.; Buzhynskyy N.; Prima V.; Sturgis, JN. e S. Scheuring. Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes. *J Mol Biol* , 369:413–418. (2007).
- Casadio R., Jacoboni I., Messina A. e V. Pinto. A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Letters* 520:1-7(2002).
- Shimizu, S., M. Narita e Y. Tsujimoto. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483–487. (1999).
- Mikhailov, V., M. Mikhailova, K. Degenhardt, M. A. Venkatachalam, E. White e P. Saikumar. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 278:5367–5376. (2003).
- Sundararajan R., Cuconati, A., Nelson, D., and White, E. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J. Biol. Chem.* 276: 45120-45127(2001).
- Keinan N., D. Tyomkin e V. Shoshan-Barmatz. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 30:5698–5709. (2010).
- Shimizu, S., Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda e Y. Tsujimoto. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis. *J Cell Biol.* 2001 Jan 22;152(2):237-50.
- Mirkin, N., J. Jaconcic, V. Stojanoff e A. Moreno. High resolution X-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins* 70:83–92. (2008).
- Lartigue, L., C. Medina, L. Schembri, P. Chabert, M. Zanese, F. Tomasello, R. Dalibart, D. Thoraval, M. Crouzet, F. Ichas, e F. De Giorgi. An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis. *J. Cell Sci.* 121:3515–3523. (2008).
- Beltran del Rio, H. and Wilson, J.E. Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 667–677 (1992).
- Desagher KS. y J. Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10:369-377(2000).
- Hill, M. M., C. Adrian e SJ. Martin. "Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." *Mol Interv* 3: 19. in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152:237–250. (2003).
- Adams JM1, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* Jan; 26 (1):61-6 (2001).
- Wang, X. "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 15(22): 2922-2936. (2001).
- Green, D. R. e G. I. Evan. "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1: 19-30. (2002).
- Huang HM, Ou HC H, Chen HL, Fowler C, Gibson GE. Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex promotes cytochrome c release from mitochondria, caspase-3 activation, and necrotic cell death. *J Neurosci Res.* Oct 15; 74 (2):309-17 (2003).
- Ancasi, RM., Ornelas IM, Cossenza M, Persechini PM e Ventura AL. ATP induces the death of developing avian retinal neurons in culture via activation of P2X7 and glutamate receptors. *Purinergic Signalling.* 8:2273-3428. (2012).
- Camara AKS, Zhou Y, Wen PC, Tajkhorshid E, Kwok WM. Mitochondrial VDAC1: A key Gatekeeper as potential Therapeutic Target. *Front Physiol.* Jun 30;8:460 (2017).
- Smilansky, A., Dangoor, L., Nakdimon, I., Ben-Hail, D., Mizrachi, D., and Shoshan-Barmatz, V. The Voltage-dependent Anion Channel 1 Mediates Amyloid beta Toxicity and Represents a Potential Target for Alzheimer Disease Therapy. *J Biol Chem* 290, 30670-30683 (2015).

### Correspondencia

Roxana Mamani Ancasi  
roxi010@hotmail.com

**Fecha de recepción:** 12 de setiembre de 2018

**Fecha de aceptación:** 05 de febrero de 2019