

00377



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

## PAPEL DE MOLÉCULAS REGULADORAS DE APOPTOSIS EN LA MUERTE DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO Y CÉLULAS DERIVADAS DE TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

Biól. SUGELA SUSANA BLANCAS ZUGARAZO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

JUNIO 2005

m345691



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Blancas Zugarazo Sugela Susana** con número de cuenta **94290783** con la tesis titulada: **"Papel de moléculas reguladoras de apoptosis en la muerte de neuronas granulares de cerebelo y células derivadas de tumores de sistema nervioso"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade**.

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles
Vocal:	Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Secretario:	Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Suplente:	Dra. Milagros Méndez Ubach
Suplente:	Dra. Limei Zhang Ji

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 3 de junio del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, con el apoyo de los donativos correspondientes a los proyectos 36235 de CONACyT y IN-222303 de PAPIIT, y con el de las becas de posgrado otorgadas por CONACyT, DEGEP y DGAPA-PAPIIT.

Agradezco.....

Al Dr. Julio Morán Andrade y a los miembros de mi comité tutorial, Dra. María Luisa Fanjul Peña y Dra. Limei Zhang Ji.

A los miembros del jurado: Dra. María Luisa Fanjul Peña, Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dr. Julio Morán Andrade, Dra. Milagros Méndez Ubach y Dra. Limei Zhang Ji.

A la Biol. María Guadalupe Domínguez Macouzet por su apoyo técnico en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, los pasados y los presentes.

*A mi madre, por todo lo que soy*

*A mis hermanos Gustavo y Raquel*

*A mis amigos de siempre y a esas personas que fueron muy importantes durante esta etapa de mi vida*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1 MUERTE CELULAR APOPTÓTICA	5
1.1a Aspectos Generales	5
1.1b Las Caspasas	7
1.2 PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS	10
1.2a Estructura de las IAPs	12
1.2b Papel de las IAPs en la Muerte Apoptótica	13
1.2c Regulación de las IAPs	18
1.2d Las IAPs en la Traducción de Señales	22
1.2e Papel de las IAPs en la Supervivencia Neuronal	24
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>28</b>
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>33</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>34</b>
5.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE NGC	34
5.2 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	34
5.3 OBTENCIÓN DE TEJIDOS	35
5.4 ANÁLISIS DE RÉPLICAS TIPO WESTERN	35
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
6.1 NIVELES DE IAPs EN NGC Y MSN	37
6.2 EFECTO DE LA MUERTE APOPTÓTICA INDUCIDA POR K5 Y STS EN LOS NIVELES DE IAPs EN NGC	40
6.3 EFECTO DE LA MUERTE APOPTÓTICA INDUCIDA POR STS EN LOS NIVELES DE IAPs EN CÉLULAS MSN	43

<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>VIII. SUMARIO</b>	<b>54</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizada por una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas, conducidas principalmente por una familia de proteasas llamadas caspasas. Entre las diversas moléculas reguladoras de apoptosis, se encuentra una familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) que actúan inhibiendo a algunas caspasas. Las IAPs también pueden participar en otros eventos celulares como la mitosis y la transducción de señales. Estas proteínas juegan un papel relevante en la sobrevivencia y proliferación celular. Así, las IAPs pueden modular procesos de sobrevivencia-muerte tanto en células tumorales como en células en diferenciación, como las neuronas granulares de cerebelo (NGC). A pesar de la importancia de las IAPs aun se desconocen los detalles de sus mecanismos de acción.

En este trabajo se exploró el papel de algunas IAPs en la sobrevivencia neuronal y de células tumorales derivadas de neuroblastoma MSN. Se utilizaron cultivos primarios de NGC, en los cuales la despolarización crónica con 25 mM de KCl (K25) promueve la sobrevivencia y la diferenciación neuronal. Se sabe que cuando las NGC se mantienen en condiciones no despolarizantes (5 mM KCl; K5) las NGC mueren apoptóticamente. La estaurosporina (STS; un inhibidor de cinasas) también induce muerte apoptótica asociada a la activación de caspasas en cultivos de NGC y en células MSN. Mediante inmunoensayos de réplica tipo Western blot, se determinaron los niveles basales de algunas IAPs en NGC en cultivo y en las células MSN, así como los cambios en los niveles de expresión en condiciones apoptóticas. En las NGC se observó una expresión basal de la cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina, pero no de BRUCE. Por su parte, las células MSN mostraron la expresión basal de cIAP-2, BRUCE y survivina, pero no de cIAP-1 ni de XIAP. En las NGC, los estímulos apoptóticos indujeron una disminución de la cIAP-1 y cIAP-

2. Sin embargo, no se vieron afectados los niveles de XIAP, BRUCE ni de survivina. Por su parte, en las células MSN la STS indujo la expresión de cIAP-1 y disminuyó los niveles de survivina, pero no se observaron cambios en la expresión de cIAP-2, XIAP y BRUCE.

Así, en este estudio encontramos la expresión basal de 3 IAPs en células MSN, de las cuales una (survivina) parece estar involucrada en la sobrevivencia de dichas células. Mientras que en las NGC encontramos la expresión basal de 4 IAPs en las NGC y observamos cambios en los niveles de 2 de estas IAPs en condiciones apoptóticas, lo que sugiere que algunas IAPs, como las cIAPs, podrían tener un papel importante en la sobrevivencia de las NGC. Así, la disminución de las cIAPs observada podría promover la activación de las caspasas-9 y -3, las cuales se activan en la apoptosis de NGC inducida por K5 y STS. Sin embargo, no queda claro qué tan determinante podría ser para la sobrevivencia de las NGC la disminución de los niveles de las cIAPs.

## ABSTRACT

Apoptosis is a type of programmed cellular death characterized for morphological and biochemistry alterations, which are mainly lead for a family of proteases called caspases. This process can be regulated by the inhibitory apoptosis proteins (IAPs) that belong to a family of proteins that negatively regulate apoptosis by acting on caspases. IAPs also participate in other cellular events such as mitosis and signal transduction. IAPs play an important role in cellular survival and proliferation. Thus, IAPs might modulate process of survival-death in tumoral cells and differentiating cells, as cerebellar granule neurons (NGC). In spite of the importance that IAPs have in these processes there is not much information about the mechanisms of action of these molecules.

In this study we explored the role of the IAPs in the survival of neurons and tumoral cells of neuroblastoma. We used primary culture of NGC that require chronic depolarization with 25 mM KCl (K25) for survival and differentiate and when they are transferred to 5 mM KCl (K5) die apoptotically. Staurosporine (STS) also induces apoptotic death mediated by the activation of caspases in NGC and MSN neuroblastoma cells. By the use of Western blot type analysis, we measured the levels of some IAPs in both NGC and MSN cells. We also evaluated the changes in IAPs expression after apoptotic stimuli in these cells. Under these conditions we found that NGC expressed cIAP-1, cIAP-2, XIAP and survivin, but not BRUCE. MSN cells expressed cIAP-2, BRUCE and survivin, but not cIAP-1 nor XIAP. In NGC, apoptotic stimulus produced a significant reduction of both cIAP-1 and cIAP-2. However, XIAP, BRUCE and survivin levels were not affected. In MSN cells, STS increased the expression of cIAP-1 and reduced the survivin levels, but there were no changes in the expression of cIAP-2, XIAP and BRUCE.

In conclusion we found the expression of 3 IAPs in MSN cells, and there was

a reduction in the levels of one of this IAPs (survivin). This result suggests that survivin is important for the survival of MSN cells. In the NGC we found the expression of 4 IAPs under survival conditions. We also observed a reduction in the levels of 2 IAPs in response to apoptotic treatments. These results suggest the possibility that some IAPs such as cIAPs have an important role in the survival of NGC. We suggest that the observed reduction of cIAPs levels induced by K5 and STS allows the activation of caspase-9 and -3 in apoptotic NGC. It is still unclear the importance of cIAPs levels for the survival of NGC.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 MUERTE CELULAR APOPTÓTICA**

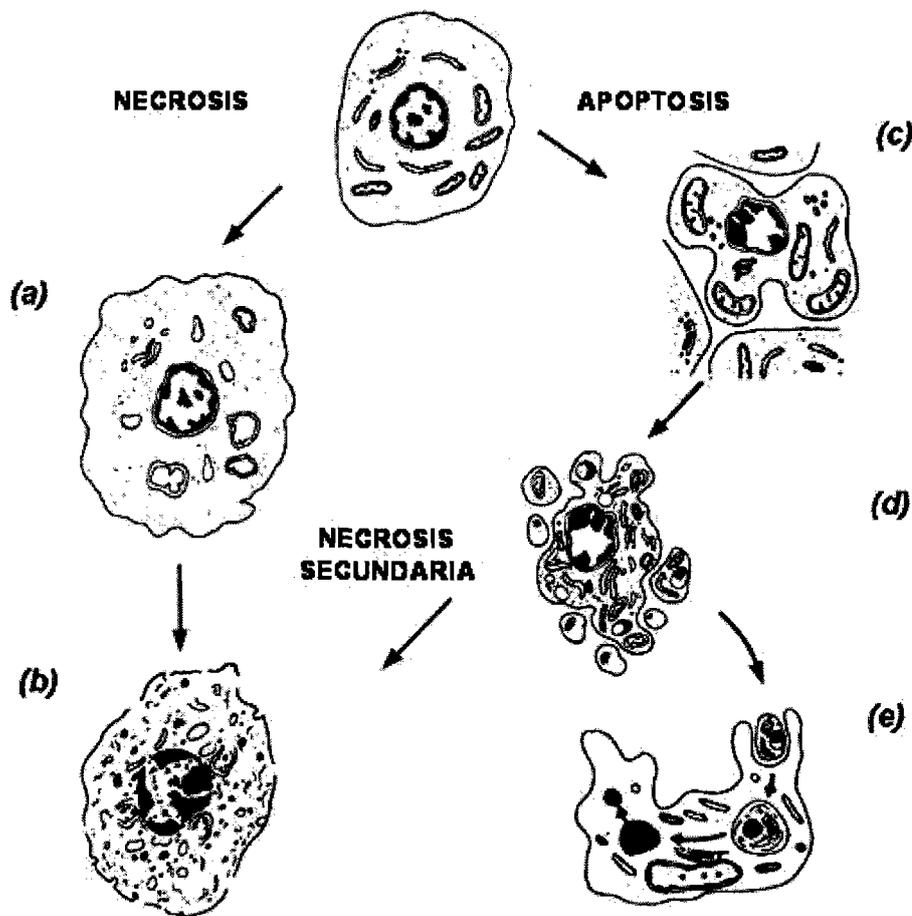
#### **1.1a Aspectos Generales**

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizada por una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas. Esta muerte ocurre en dos fases: primero la célula se compromete a morir y después se presenta una fase ejecutora, caracterizada por cambios morfológicos notables. La apoptosis, a diferencia de la necrosis, se caracteriza por ser una muerte activa en la que participa una maquinaria compleja responsable de una serie de características morfológicas y bioquímicas que definen esta muerte.

La apoptosis fue definida originalmente en función a cambios morfológicos (Fig. 1) que incluyen: condensación y fragmentación nuclear, compactación de organelos citoplasmáticos, decremento en el volumen celular, alteraciones en la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos con material citoplasmático y nuclear, que son fagocitados por células vecinas (Gorman *et al*, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas características morfológicas se han utilizado tradicionalmente como marcador de células en estado apoptótico.

Bioquímicamente, la apoptosis se caracteriza por una serie de eventos de desensamblaje de estructuras subcelulares, ejecutada por una maquinaria celular compleja y especializada, conducidos principalmente por una familia de proteasas llamadas caspasas (Gorman *et al*, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). Dentro de las características bioquímicas de la apoptosis se encuentran la fragmentación internucleosomal del ADN, la externalización de fosfatidil serina, y la activación de familias de proteínas encargadas de conducir el proceso apoptótico, como la familia de las caspasas y de Bcl-2.

Se han descrito dos rutas convergentes de muerte apoptótica (Fig. 2): la ruta extrínseca y la ruta intrínseca. La ruta extrínseca está mediada por receptores de muerte (por ejemplo el receptor al factor de necrosis tumoral: TNFR); en este caso, la activación del receptor por su ligando resulta en la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), el reclutamiento de caspasa-8 y su subsiguiente autoactivación. Posteriormente la caspasa-8 activa a la caspasa-3 y esta última degrada los substratos subcelulares. La ruta intrínseca o mitocondrial, la cual puede ocurrir después de un daño al DNA, inicia con la salida de citocromo c



**Figura 1. Cambios morfológicos asociados a muerte apoptótica y necrótica.** En la muerte necrótica ocurre hinchamiento (a) y lisis celular (b) lo cual conduce a una reacción inflamatoria en el tejido. En la muerte apoptótica se mantiene la integridad de la membrana citoplasmática y de los organelos y hay condensación perinuclear de la cromatina (c). Finalmente la célula se desintegra con la formación de cuerpos apoptóticos (d) que son posteriormente fagocitados (e).

de la mitocondria al citoplasma. Ya en el citoplasma, el citocromo c se asocia con Apaf-1 y en presencia de ATP se forma el apoptosoma con el reclutamiento y activación de caspasa-9, la cual a su vez activa a la caspasa-3.

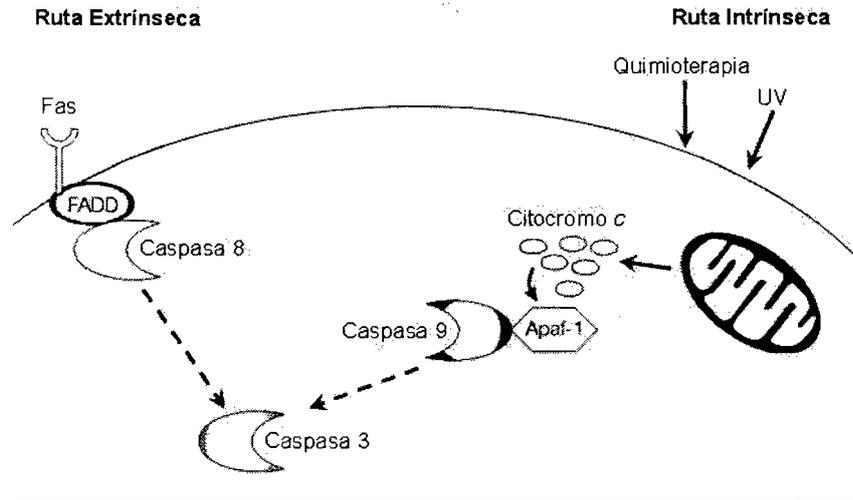
### **1.1b Las Caspasas**

El término de “caspasa” hace referencia a la habilidad o capacidad de estas proteasas de cisteína de romper proteínas en un residuo de ácido aspártico (Cohen, 1997). Todas las caspasas se expresan como zimógenos catalíticamente inactivos (Fig. 3a) de 30-50 KDa que contienen un prodominio, una subunidad grande (~20 KDa) y una subunidad pequeña (~10 KDa) (Thornberry y Lazebnik, 1998; Shi, 2004). Todas las caspasas contienen como sitio activo un pentapéptido de estructura general QACXG, donde X es R, Q o G (Cohen, 1997).

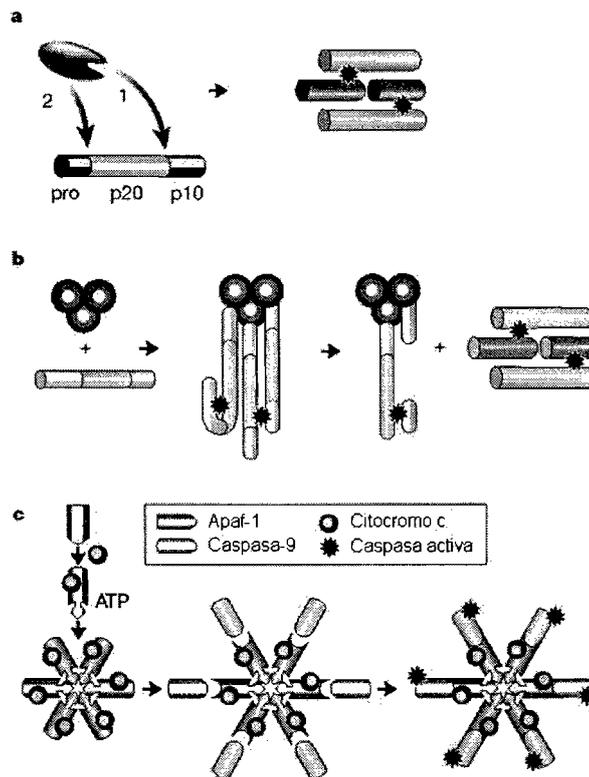
De acuerdo a su participación en la cascada proteolítica, las caspasas involucradas en la apoptosis se clasifican en dos grupos: caspasas iniciadoras (como las caspasas-8 y -9); y caspasas efectoras (como las caspasas-3 y -7). Las caspasas iniciadoras contienen un prodominio amino-terminal mayor a 90 residuos de aminoácidos mientras que el prodominio de las caspasas efectora es de 20-30 residuos de aminoácidos (Shi, 2004).

La activación de estas enzimas involucra un procesamiento proteolítico en los sitios de corte específicos a aspartato entre los tres diferentes dominios (Fig. 3 a), seguido por una reasociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterotetrámero activo (Thornberry y Lazebnik, 1998; Budihardjo *et al*, 1999) que consta de 2 subunidades grandes y 2 subunidades pequeñas con la presencia de 2 sitios catalíticos (Fig. 3 a). Las caspasas efectoras existen constitutivamente como homodímeros antes y después del procesamiento proteolítico (Shi, 2004).

Como consecuencia del procesamiento proteolítico ya mencionado, la



**Figura 2. Rutas de muerte apoptótica.** Ruta extrínseca: La apoptosis mediada por receptores se inicia con el reclutamiento y activación de caspasa-8, la cual puede activar directamente a la caspasa-3. Ruta intrínseca: Resulta de la liberación de la mitocondria de citocromo c, la oligomerización de Apaf-1 en un complejo con caspasa-9 (el apoptosoma), lo que induce la activación de esta caspasa y subsecuentemente la de caspasa-3. FADD, proteína con dominio de muerte asociada a Fas; UV, luz ultravioleta; (Modificado de Salvesen y Duckett, 2002).



**Figura 3. Mecanismo de activación de caspasas.** a) La activación de caspasas puede ocurrir por la fragmentación proteolítica por otra proteasa. Este mecanismo es el más común para la activación de caspasas efectoras por otra caspasa. También es probablemente usado en la inducción de caspasas por otro tipo de proteasas. Prodominio: pro; subunidad grande: p20; subunidad pequeña: p10; 1: corte entre p20 y p10; 2: corte entre pro y p20. b) El mecanismo de activación puede ser inducido por proximidad. Con la formación de DISC se da el reclutamiento de varias moléculas de procaspasa-8 en gran proximidad, lo que resulta en su activación. c) Otro mecanismo es la formación de una holoenzima (apoptosoma) con la presencia de procaspasa-9. La activación de caspasa-9 es mediada por cambios conformacionales, no proteólisis (Modificado de Hengartner, 2000).

actividad catalítica de las caspasas efectoras se incrementa varios órdenes de magnitud (Salvesen y Dixit, 1999; Shi, 2004). Por el contrario, el procesamiento autocatalítico en las caspasas iniciadoras tiene un modesto efecto en su actividad catalítica (Stennicke *et al*, 1999; Srinivasula *et al*, 2001). Por ejemplo, la caspasa-9 completamente procesada y aislada se encuentra con una actividad parcial similar al zimógeno no procesado. En contraste, la asociación de esta caspasa con el apoptosoma incrementa su actividad catalítica tres órdenes de magnitud tanto de la caspasa-9 procesada como de la no procesada (Rodríguez y Lazebnik, 1999; Srinivasula *et al*, 2001).

Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo de activación de una caspasa iniciadora. Primero se sugirió el modelo de “Inducción por Proximidad” (Salvesen y Dixit, 1999; Shi, 2004), el cual indica que las caspasas iniciadoras se autoprocenan cuando se encuentran próximas unas de otras.

Más recientemente, se ha propuesto el modelo de “Dimerización Inducida por Proximidad” (Boatright y Salvesen, 2003; Shi, 2004), el cual asume que la dimerización observada en las caspasas es el factor que conduce a su activación (Renatus *et al*, 2001; Boatright *et al*, 2003; Donepudi *et al*, 2003; Shi, 2004). Basados en esto, la función del apoptosoma sería promover la homodimerización. Así como el apoptosoma se requiere para la activación de caspasa-9 (Fig. 3c), el ensamblaje de DISC es indispensable para la activación de caspasa-8 (Fig. 3b) (Peter y Krammer, 2003; Shi, 2004). Recientemente se ha descrito el inflammasoma (Tschopp *et al*, 2003; Shi, 2004), el cual facilita la activación de caspasas proinflamatorias involucradas en el procesamiento de citocinas. Se ha propuesto que la caspasa-2 se activa por el PID-Dosoma (Tinel y Tschopp, 2004; Shi, 2004).

Se ha propuesto que durante un evento apoptótico, las caspasas actúan de manera secuencial, en una cascada de activación de caspasas y de degradación de

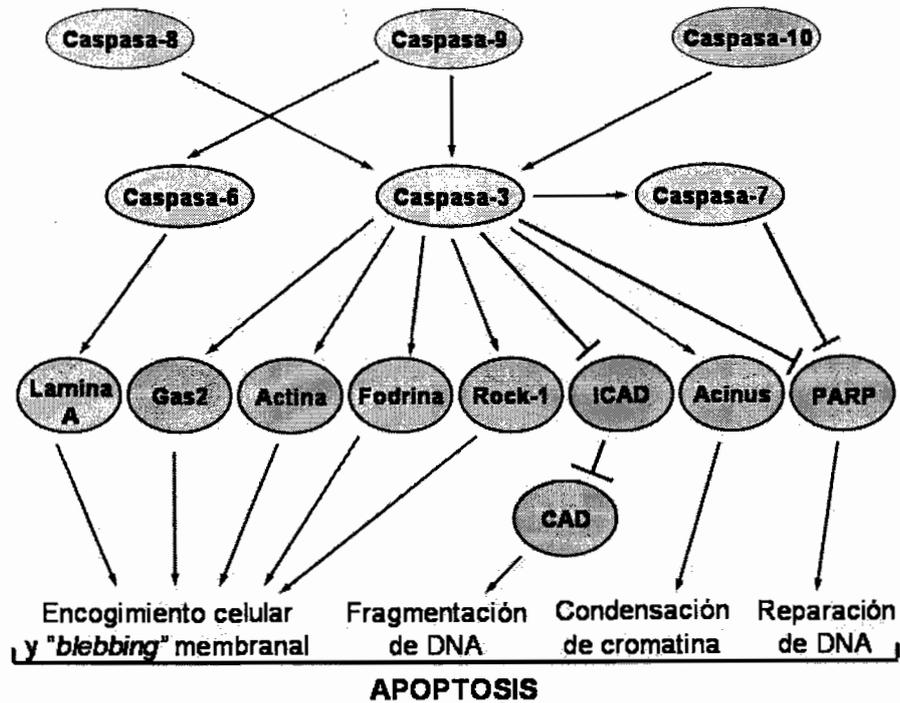
estructuras subcelulares (Fig. 4). Las caspasas iniciadoras, como la caspasa-8, -9, y -10, activan a las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras, caspasas-3, -6 y -7 actúan directamente sobre substratos subcelulares específicos para cada caspasa. Entre los substratos de estas caspasas se encuentran proteínas como la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), láminas de la envoltura nuclear, U1-70 KDa (ribonucleoproteína nuclear pequeña), entre otros.

## 1.2 PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS

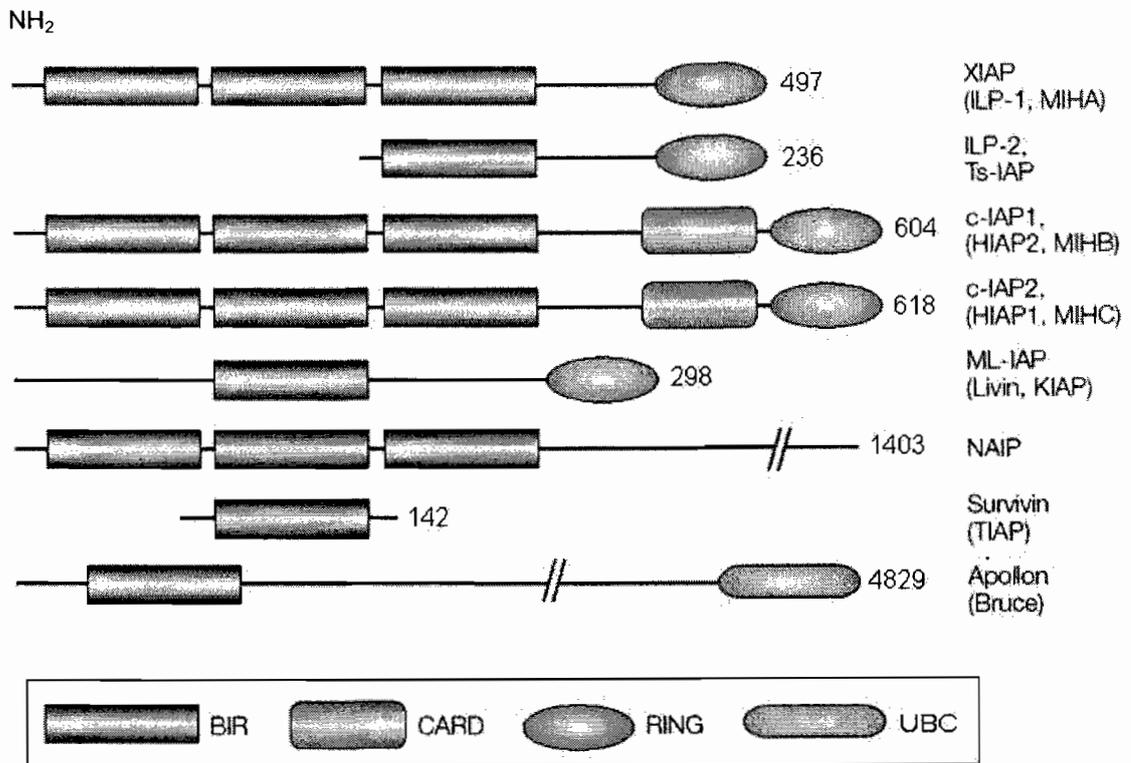
Entre las diversas moléculas reguladoras de apoptosis, existe una familia de proteínas involucradas en la regulación negativa de la apoptosis. Dichas moléculas se conocen como proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs, *inhibitor of apoptosis proteins*). Hasta el momento se ha descrito la presencia de IAPs en virus, levaduras, nemátodos, insectos y mamíferos (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). En humanos se han identificado ocho IAPs (Fig. 5), denominadas: NAIP, cIAP-1/hIAP-2/MIHB, cIAP-2/hIAP-1/MIHC, XIAP/hILP-1/MIHA, survivina/TIAP, ILP-2/Ts-IAP, ML-IAP/Livin/KIAP y Bruce/Apollon (Rothe *et al*, 1995; Duckett *et al*, 1996; Liston *et al*, 1996; Ambrosini *et al*, 1997; Hauser *et al*, 1998; Chen *et al*, 1999; Vucic *et al*, 2000; Richter *et al*, 2001; Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002).

Las IAPs exhiben otras funciones además de regular la muerte apoptótica (Suzuki *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). Por ejemplo, la survivina juega un papel importante en la regulación de la mitosis (Li *et al*, 1999; en Nachmias *et al*, 2004) y otras IAPs, como la cIAP-1 y -2, están involucradas en procesos de transducción de señales (Rothe *et al*, 1995; en Nachmias *et al*, 2004).

Las IAPs bloquean la apoptosis por su habilidad de inhibir directamente caspasas. Un aspecto importante de las IAPs es que son los únicos factores celulares que pueden actuar tanto en caspasas iniciadoras como efectoras



**Figura 4. Cascada proteolítica de las caspasas.** Esquema de la cascada proteolítica de caspasas que se observa en la muerte apoptótica. Las caspasas iniciadoras (-8, -9 y -10) proteolizan y activan a las caspasas ejecutoras (-6, -3 y -7). Las caspasas ejecutoras proteolizan a sus respectivos sustratos proteicos.



**Figura 5. IAPs de mamíferos.** Los nombres alternativos para cada IAP se muestran entre paréntesis. Los números que se observan en el extremo carboxilo-terminal indican la cantidad total de aminoácidos de cada IAP. Se observa la ubicación de los dominios estructurales de las IAPs; BIR, CARD, RING y UBC. NH<sub>2</sub>, amino-terminal. Su descripción se detalla en el texto (Modificado de Salvesen y Duckett; 2002).

(Deveraux *et al*, 1999b; Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002; Shi, 2002b; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004). Por otro lado, los efectos biológicos de estas proteínas pueden convertirse de anti- a proapoptóticos (Clem *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2003; Nachmias *et al*, 2004), ya que algunas IAPs son sustrato de caspasas y ciertos fragmentos resultantes de la proteólisis de las IAPs por caspasas son proapoptóticos.

Las IAPs muestran una localización intracelular diferencial. La XIAP se ubica en el citosol. La cIAP-1 y -2 interactúan con el complejo intracelular del receptor al factor de necrosis tumoral (TNFR) y muestran una localización membranal y perinuclear (Verhagen *et al*, 2001). La ML-IAP, que se restringe a tejido adulto y líneas celulares de cáncer, se expresa en el núcleo y estructuras filamentosas del citoplasma (Vucic *et al*, 2000). Por su parte, BRUCE, que se expresa en casi todos los tejidos, es la única IAP que se une periféricamente a la membrana de la red trans-Golgi y a estructuras vesiculares (Hauser *et al*, 1998; Chen *et al*, 1999).

### **1.2a Estructura de las IAPs**

Las IAPs se caracterizan por presentar una o más copias de un dominio altamente conservado denominado BIR (*baculovirus IAP repeat*; Fig. 5) (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). Todas las IAPs contienen en el extremo amino-terminal, al menos una copia de BIR, la cual consta de entre 70-80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc (Ambrosini *et al*, 1997; Budihardjo *et al*, 1999; Shi, 2004). Los dominios BIR son esenciales para la propiedad antiapoptótica de las IAPs (Duckett *et al*, 1998; Salvesen y Duckett, 2002).

Además de BIR, algunas IAPs de mamíferos, de mosca y de virus también presentan el dominio conservado denominado RING que igualmente une zinc (Fig.

5). El motivo RING se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de las proteínas (Liston *et al*, 1996; Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). Varias proteínas con diferentes funciones contienen el dominio RING (Salvesen y Duckett, 2002). Las proteínas que poseen el dominio RING pueden catalizar la degradación de sí mismas y de sus proteínas blanco a través de ubiquitinación.

Particularmente, la cIAP-1 y la cIAP-2 también poseen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (Fig. 5; Hofmann *et al*, 1997), localizado entre los dominios BIR y RING (Deveraux y Reed, 1999). No se ha comprobado un papel directo de CARD en la función antiapoptótica de las IAPs. Fragmentos amino-terminales de las cIAPs que contienen sólo BIR sin CARD retienen su actividad antiapoptótica, lo que implica que el dominio CARD no es necesario para dicha actividad (Roy *et al*, 1997). Por su parte, se ha reportado que cIAP-1 se une a CARDIAK/RIP2/RICK, una proteína que contiene un dominio CARD y un dominio de cinasa serina/treonina similar al que se encuentra en RIP (proteína inductora del factor de transcripción NF $\kappa$ B) (McCarthy *et al*, 1998; Thome *et al*, 1998). Se sabe que RIP2 se une e induce la activación de procaspasa-1 (Thome *et al*, 1998); sin embargo no está clara la relevancia de que cIAP-1 pueda unirse a RIP2 (Deveraux y Reed, 1999).

Existe otro dominio importante que se encuentra en BRUCE. Esta IAP contiene un dominio conjugante de ubiquitina (UBC) funcionalmente intacto (Fig. 5; Hauser *et al*, 1998; Deveraux y Reed, 1999). El dominio UBC le confiere a BRUCE una actividad de E2 en el sistema del proteosoma (Hauser *et al*, 1998).

### **1.2b Papel de las IAPs en la Muerte Apoptótica**

La principal actividad antiapoptótica descrita para las IAPs, es su capacidad de inhibir directamente a las caspasas. Además de XIAP, hay evidencias de la

inhibición de caspasas por otras IAPs, como lo son: cIAP-1, cIAP-2, livin, DIAP1 (de *Drosophila sp*) (Verhagen *et al*, 2001; Henning *et al*, 2002) e ILP-2 (Richter *et al*, 2001; Henning *et al*, 2002). XIAP, cIAP-1, cIAP-2 y survivina directamente se unen e inhiben caspasa-3, -7 y -9 (Nachmias *et al*, 2004). Se ha observado que IAPs con un solo BIR, así como Livin, también son capaces de inhibir caspasa-3, -7 y -9 (Vucic *et al* 2000; Nachmias *et al*, 2004). No obstante, en condiciones *in vitro*, XIAP es el más potente inhibidor de caspasas-3 y -7 mientras que cIAP-1 y -2 tienen una acción inhibitoria aproximadamente 100 veces más débil que XIAP (Shi, 2004). Por su parte, ILP-2 inhibe caspasa-9 (Richter *et al*, 2001) y NAIP inhibe caspasa-3 y -7 (Nachmias *et al*, 2004). Finalmente, también BRUCE es capaz de inhibir caspasas, y requiere la integridad de su dominio BIR para dicho efecto. La sobreexpresión de BRUCE sin un dominio BIR funcional, aumenta la apoptosis, lo cual puede ser consecuencia de la formación de homodímeros de la proteína mutante. La actividad inhibitoria de caspasas que presenta BRUCE es aproximadamente diez veces menor que la de XIAP. BRUCE también parece actuar sobre las caspasas-3, -7 (Bartke *et al*, 2004) y -9 (Hao *et al*, 2004).

De las IAPs humanas, la XIAP es la mejor caracterizada. XIAP contiene 3 dominios BIR (BIR1, BIR2 y BIR3; Fig. 5 y 6) que no son funcionalmente equivalentes. No se conoce la función de dominio BIR1 de la XIAP mientras que las caspasas-3 y -7 son el blanco de la secuencia amino-terminal que precede a BIR2 y la caspasa-9 es inhibida por BIR3 (Fig. 6; Henning *et al*, 2002; Shi, 2004). La unión de caspasa-3 y -7 a la XIAP ocurre por un mecanismo idéntico (Chai *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Riedl *et al*, 2001; Shi, 2004).

El análisis cristalográfico de XIAP revela que los aminoácidos conservados en la región de enlace entre BIR1 y BIR2 es la secuencia más crítica para la inhibición de caspasa-3 y -7 (Fig. 6b; Riedl *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). BIR

es requerido para alinear y estabilizar la estructura caspasa-IAP (Chai et al, 2001; Huang et al, 2001; Nachmias et al, 2004). La secuencia de inhibición simplemente se une al sitio activo de la caspasa para excluir algún otro sustrato. El mecanismo fundamental de inhibición de caspasa-3 y -7 por BIR2 es la restricción al acceso del sustrato (Riedl et al, 2001; Henning et al, 2002; Nachmias et al, 2004; Shi, 2004). Específicamente, la interacción ocurre entre la parte amino-terminal de la región flexible que precede a BIR2 y la hendidura que une al sustrato de la proteasa (Henning et al, 2002). A pesar de que la secuencia de enlace entre BIR1 y BIR2 de XIAP juega un papel predominante en la inhibición de caspasa-3 y -7, este fragmento aislado no inhibe a las caspasas (Sun et al, 1999; Chai et al, 2001; Shi, 2004). Dicha secuencia de XIAP, fusionada al extremo amino- o carboxilo-terminal de BIR1 es capaz de unir e inhibir a la caspasa-3, mientras que BIR1 o BIR2 aislados no tienen efecto inhibitorio (Sun et al, 1999; Shi, 2004).

Por lo anterior se ha sugerido que el péptido que enlaza a BIR1 con BIR2 necesita presentarse en una conformación adecuada, que se establece por un dominio circundante plegado (Shi, 2004). Un dato que apoya dicha hipótesis es que el péptido de enlace fusionado con glutathione S-transferasa (GST) es capaz de inhibir las caspasas -3 y -7. Sin embargo, el dominio BIR contribuye en la inhibición de caspasas, ya que XIAP exhibe una potencia 20 veces mayor que el péptido fusionado a GST (Chai et al, 2001; Huang et al, 2001; Shi, 2004).

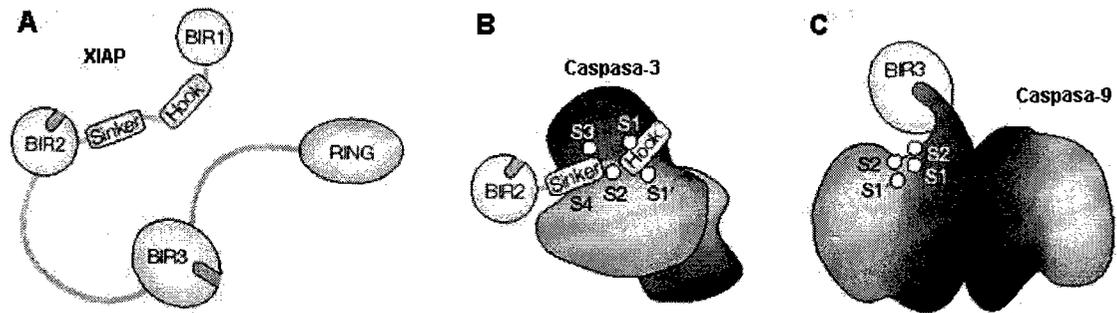
La función principal del dominio BIR puede ser el alineamiento y la estabilización de la interacción inhibitoria IAP-caspasa (Riedl et al, 2001; Henning et al, 2002). Pero hay que tener en mente que en la estructura del cristal del complejo XIAP-caspasa-7 no se observa contacto entre el dominio BIR y la caspasa (Chai et al, 2001; Huang et al, 2001; Henning et al, 2002). Los BIRs también son sitios de unión a proteínas como SMAC/Diablo (Verhagen et al, 2001; Henning et al, 2002) y

HtrA2 (Suzuki *et al*, 2001; Henning *et al*, 2002).

Teniendo como modelo la interacción BIR2-caspasa-7, el modelaje de la estructura BIR3-caspasa-9 no parece ser estable en términos estéricos. Estudios mutacionales indican que BIR3 necesita el extremo amino-terminal de la subunidad pequeña de caspasa-9 para un enlace eficiente (Srinivasula *et al*, 2001; Henning *et al*, 2002). De este modo, los requerimientos indispensables para la inhibición de caspasa-9 por XIAP están localizados en la superficie del surco del dominio BIR3 y el motivo tetrapéptido que une IAP (IBM) en la caspasa-9 (Fig. 6c; Shi, 2004). La secuencia del IBM de caspasa-9 es Ala-Thr-Pro-Phe (Srinivasula *et al*, 2001).

La unión del tetrapéptido de caspasa-9 a XIAP es la principal contribución a la inhibición, pero otras interacciones débiles parecen ser esenciales. Por ejemplo, la mutación de la His343 en BIR3 resulta en una pérdida completa de la inhibición, lo que sugiere que ese aminoácido es importante para el contacto con caspasa-9 (Sun *et al*, 2000; Shi, 2004). La estructura del cristal de la caspasa-9 unida a BIR3 de XIAP (Shiozaki *et al*, 2003) sugiere que en el estado no inhibido la caspasa procesada existe exclusivamente como monómero. Este monómero tiene el potencial para ser activado por el apoptosoma o de ser inhibido por XIAP. XIAP inhibe potencialmente la actividad catalítica de la caspasa usando BIR3 para heterodimerizar con el monómero de la caspasa-9 a través de la misma interfase que es requerida para la homodimerización de la caspasa (Shi, 2004).

Así, XIAP inhibe la caspasa-9 por el secuestro de ésta en un estado monomérico, lo cual sirve para prevenir la actividad catalítica (Shi, 2004). En la ausencia de procesamiento proteolítico, la procaspasa-9 es incapaz de formar complejos estables con IAPs, ya que el IBM no está expuesto en el extremo amino-terminal. El procesamiento proteolítico de la procaspasa-9 en Asp315 conduce a la exposición del IBM (Shi, 2004).



**Figura 6. Inhibición de las caspasas-3 y -9 por XIAP.** A) Esquema representativo de la XIAP, se observan los 3 dominios BIR y el dominio RING. B) Interacción entre la caspasa-3 y XIAP. El segmento de XIAP entre los dominios BIR1 y BIR2 interacciona con la caspasa-3. C) Interacción entre la caspasa-9 y las XIAP. El surco del dominio BIR3 se une a la caspasa-9. (Modificado de Salvesen y Duckett; 2002).

El reconocimiento específico de la caspasa-9 que se encuentra en interfase de dimerización requiere de 4 aminoácidos en el dominio BIR3 de XIAP, los cuales no están conservados en el dominio BIR3 de cIAP-1 o cIAP-2. Estas observaciones indican que a pesar de que cIAP-1 y cIAP-2 pueden unirse a la caspasa-9 involucrando interacciones con su IBM, ninguna de las dos cIAPs puede interactuar con caspasa-9 que se encuentra en interfase de dimerización de la caspasa. Así, la caspasa-9 no debiera ser sujeta a inhibición por cIAP-1 o cIAP-2. El dominio BIR3 de cIAP-1 o cIAP-2 no exhibe ningún efecto sobre la actividad catalítica de caspasa-9 (Shiozaki *et al*, 2003; Shi, 2004).

Por otro lado, la actividad de ligasa de ubiquitina (E3) de las IAPs, debido a la presencia de RING, ha mostrado promover la degradación de sus substratos. Por ejemplo, XIAP puede ubiquitinar a la caspasa-3 activa y de este modo marcarla para su degradación proteosomal (Suzuki *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004).

Recientemente, Smac fue identificado como sustrato de la actividad E3 de XIAP (MacFarlane *et al*, 2002). No está claro el mecanismo por el cual las IAPs aumentan su propia degradación o de sus blancos (Nachmias *et al*, 2004). También BRUCE ubiquitina a Smac; dicha actividad de BRUCE depende del dominio UBC catalíticamente activo y el dominio BIR plegado apropiadamente, el cual se une al

substrato Smac. BRUCE aparentemente cataliza la monoubiquitinación de Smac (Bartke *et al*, 2004), a diferencia de XIAP, la cual es capaz de multiubiquitinar a la proteína (MacFarlane *et al*, 2002). La monoubiquitinación de Smac por BRUCE podría ocurrir para regularla (Bartke *et al*, 2004). Sin embargo, también se ha reportado que Apollon (BRUCE humana) ubiquitina y facilita la degradación proteosomal de Smac y caspasa-9 (Hao *et al*, 2004).

Por su parte, estudios recientes han mostrado que la interacción entre survivina y Smac es crucial para la habilidad de survivina de inhibir la apoptosis inducida por taxol (Song *et al*, 2003; Nachmias *et al*, 2004).

### **1.2c Regulación de las IAP**

Las IAPs son reguladas positiva y negativamente a varios niveles. La expresión de las IAPs se regula a nivel transcripcional. Las IAPs tienen diferentes patrones de expresión genética, lo cual sugiere que los miembros de esta familia multigénica no son redundantes (Nachmias *et al*, 2004). Por ejemplo, hay diferentes patrones de expresión de Livin, XIAP y survivina durante el curso de activación de linfocitos (Nachmias *et al*, 2004). El factor transcripcional NF $\kappa$ B controla la transcripción de varios genes reguladores de apoptosis incluyendo a la XIAP, cIAP-1 y cIAP-2 (Nachmias *et al*, 2004). Asimismo, la ruta de señalización de Akt/PkB promueve la sobrevivencia celular; Akt induce una regulación a la baja de proteínas proapoptóticas y una regulación a la alza de proteínas antiapoptóticas como las IAPs y miembros de la familia Bcl-2 (Hersey y Zhang, 2003). A nivel traduccional, el mRNA de la XIAP contiene una secuencia no traducible en el extremo 5' conocida como IRES (*internal ribosomal entry site*). Durante la apoptosis se inhibe la traducción de proteínas dependiente de cap (Clemens *et al*, 2000). Se cree que las secuencias IRES continúan su traducción bajo dichas circunstancias celulares

(Holcik *et al*, 2000a; Nachmias *et al*, 2004):

Por su parte, la actividad antiapoptótica de las IAPs es inhibida por una familia de proteínas que contienen un motivo tetrapéptido que une IAP (IBM, *IAP-binding motif*) (Shi, 2002a; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004). Un miembro de dicha familia es Smac/DIABLO (Du *et al*, 2000; Verhagen *et al*, 2000). Smac se sintetiza en el citoplasma y es transportado al espacio intermembranal de la mitocondria (Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004). Cuando se presenta un estímulo apoptótico, se libera al citoplasma e interactúa con múltiples IAPs eliminando la inhibición de caspasas iniciadoras y efectoras mediada por IAPs (Chai *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004).

Smac recién sintetizada contiene 239 aminoácidos. En su extremo amino-terminal, 55 residuos codifican la secuencia de localización mitocondrial, los cuales son proteolíticamente removidos en la proteína Smac madura (Du *et al*, 2000; Verhagen *et al*, 2000; Shi, 2004). Como resultado de la proteólisis de Smac inmadura, ocurre la exposición de 4 aminoácidos hidrofóbicos (Ala-Val-Pro-Ile) en el extremo amino-terminal de Smac madura. Dicho tetrapéptido representa el péptido de los miembros de la familia de proteínas con IBM en mamíferos y en *Drosophila sp* (Shi, 2002a; Shi, 2004). El análisis estructural revela que el IBM se une a la superficie del surco conservado de BIR3 de XIAP; en dicha unión la Ala es esencial (Liu *et al*, 2000; Wu *et al*, 2000). El IBM de Smac es similar al de caspasa-9 y por eso libera completamente la inhibición de caspasa-9 mediada por XIAP (Shi, 2004).

A pesar de que el IBM de Smac aislado contrarresta la inhibición de caspasa-9 por XIAP, éste juega un papel menos directo en la remoción de la inhibición de caspasas efectoras por IAPs (Shi, 2004). La unión del tetrapéptido de Smac a la superficie del surco de BIR2 no puede remover la inhibición de caspasa-3 y -7. Sin embargo, Smac madura si es capaz de eliminar la inhibición de caspasa-3

mediada por XIAP (Shi, 2004). Estudios con modelaje indican que una vez que el dominio BIR2 está unido a Smac madura, el péptido requerido para la inhibición de caspasa-3 está parcialmente cubierto por Smac (Chai *et al*, 2001). Así, queda excluida una unión simultánea de BIR2 a caspasa-3 y Smac (Shi, 2004). En este modelo, la unión a BIR2 requiere no sólo del IBM de Smac sino también de una extensa superficie disponible sólo en el dímero de Smac. Lo que es consistente con la observación de que Smac monomérica interacciona débilmente con BIR2, y es incapaz de remover la inhibición mediada por IAP de caspasa-3 (Chai *et al*, 2000; Shi, 2004).

Smac también se une a BRUCE y elimina su función inhibidora. Por un lado, por el desalojo de las caspasas unidas al dominio BIR, y por el otro, previniendo el enlace de BRUCE con las caspasas (Bartke *et al*, 2004).

Los BIR de la XIAP también se unen a Omi/Htra2 y al factor asociado a XIAP (XAF-1). Al igual que Smac, XAF-1 tiene la habilidad de impedir la inhibición de caspasas mediada por XIAP (Wu *et al*, 2000; Liston *et al*, 2001; Suzuki *et al*, 2001; Hegde *et al*, 2002; Nachmias *et al*, 2004). XAF-1 es una proteína nuclear que se induce por interferón y su sobreexpresión neutraliza el efecto antiapoptótico de la IAP por su secuestro en el núcleo (Liston *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004).

Otro mecanismo de regulación de las IAPs es el hecho de que éstas pueden ser fragmentadas por las caspasas. Las caspasas efectoras -3, -6 y -7 son responsables de la fragmentación proteolítica de las diferentes IAPs. La proteólisis específica y funcional por caspasas se ha descrito en XIAP, cIAP-1 y Livin (Nachmias *et al*, 2004). La proteólisis de XIAP por caspasas produce dos fracciones, una comprende a BIR1-2 y la otra a BIR3-RING. El fragmento amino-terminal de BIR1-2 muestra un débil efecto inhibitorio de la caspasa-3 y -7, mientras que la fracción BIR3-RING retiene su capacidad de inhibir caspasa-9 (Deveraux *et*

*al*, 1999a; Nachmias *et al*, 2004). El corte en cIAP-1 ocurre inmediatamente después de BIR3 y produce un fragmento carboxilo-terminal proapoptótico, en el cual el dominio RING está precedido por una secuencia espaciadora de aminoácidos (Clem *et al*, 2001). No es sorprendente la actividad proapoptótica del fragmento de cIAP-1 sin BIR, ya que los dominios RING de otras IAPs de baculovirus y de mamíferos son capaces de inducir apoptosis cuando se expresan sin su dominio BIR (Harvey *et al*, 1997; Nachmias *et al*, 2004). Livin se fragmenta por caspasas efectoras en el Asp52 y se produce una subunidad carboxilo-terminal grande que contiene a BIR y RING (Nachmias *et al*, 2003). Sin embargo, el fragmento de Livin muestra una actividad proapoptótica a pesar de contener el dominio BIR. Se sugiere la existencia de un motivo desconocido en los primeros 52 aminoácidos de Livin, que puede modular el efecto antiapoptótico de BIR. La ausencia de dicho motivo puede aumentar la actividad E3 de RING que a su vez marca a otras proteínas antiapopticas para su degradación mediada por el proteosoma (Nachmias *et al*, 2004).

Se encontró que BRUCE es sustrato de caspasas. La fragmentación hecha por caspasas resulta en un fragmento de BRUCE que contiene el dominio BIR completo. Sorpresivamente este fragmento quedó completamente carente de la actividad de IAP, sugiriendo que otras propiedades de BRUCE, así como la homodimerización, se requieren además del dominio BIR para la función de IAP (Bartke *et al*, 2004).

La fosforilación también ha mostrado estar involucrado en la regulación de algunas IAPs. Recientemente se ha observado un efecto de sobrevivencia por la fosforilación de XIAP por Akt. La fosforilación de XIAP reduce su ubiquitinación, lo cual resulta en una gran estabilidad de XIAP (Dan *et al* 2004). Sin embargo la relevancia de la fosforilación no está clara (Nachmias *et al*, 2004).

Por otro lado, en respuesta a un estímulo apoptótico, XIAP y cIAP-1 entran en un proceso de autoubiquitinación, lo cual las marca para la degradación proteosomal (Yang *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004). La autoubiquitinación es un mecanismo mediante el cual ciertas IAPs pueden regular negativamente su propia actividad (Nachmias *et al*, 2004).

### **1.2d Las IAPs en la Transducción de Señales**

Existen varios reportes que apuntan a un papel importante de algunos miembros de la familia de las IAPs en procesos de transducción de señales. En el caso específico de la cIAP-1 y la cIAP-2, éstas son las únicas IAPs que se han identificado bioquímicamente (Rothe *et al*, 1995) como parte de un complejo de señalización que se recluta al dominio citoplasmático del receptor al factor de necrosis tumoral tipo 2 (TNFR2) (Fig. 7a; Salvesen y Duckett, 2002).

Se sabe que cIAP-1 y -2 no tienen contacto directo con TNFR2, sino que son reclutadas al receptor por la unión de sus respectivos dominios BIR al heterocomplejo TRAF1/TRAF2 (Fig. 7a; Rothe *et al*, 1995). Se ha reportado que la unión del factor de necrosis tumoral (TNF) a TNFR2 induce la ubiquitinación y degradación proteasomal del factor asociado a TNFR tipo 2 (TRAF2), mediada por cIAP-1 (Li *et al*, 2002; Aggarwal, 2003). También, se ha descrito que TRAF1, TRAF2 y las cIAPs trabajan conjuntamente para suprimir la apoptosis inducida por TNF en el complejo intracelular de señalización de TNFR1 (Wang *et al*, 1998; Park *et al*, 2000; Cheng *et al*, 2002).

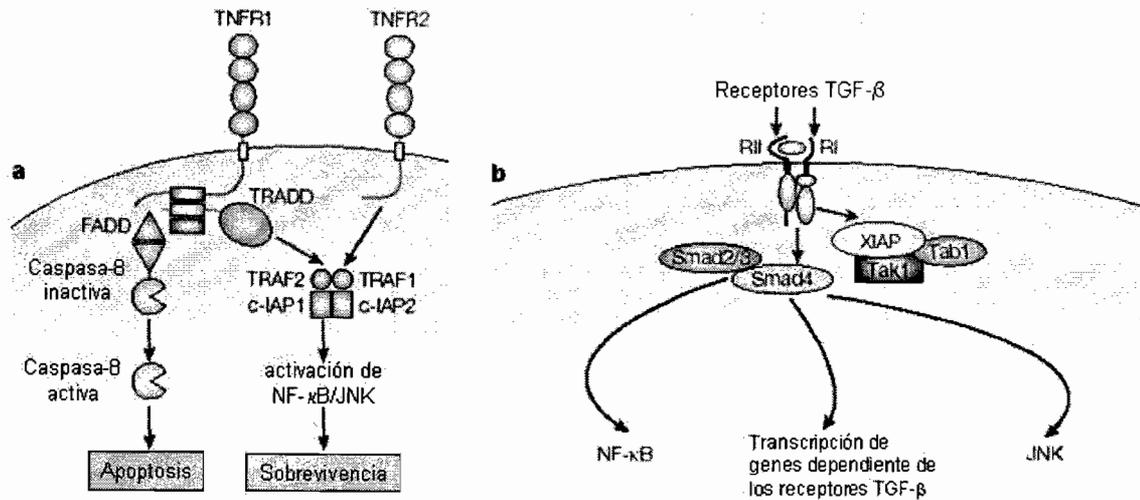
Por su parte, cIAP-2 se ha implicado funcionalmente en la activación de NF $\kappa$ B (el cual induce la expresión de varios genes antiapoptóticos incluyendo los de las IAPs) y protección de la apoptosis promovida por TNF (Chu *et al*, 1997). TNF $\alpha$  induce la expresión de cIAP-2 a través de la activación de NF $\kappa$ B. Asimismo, la

sobreexpresión de cIAP-2 también puede conducir a la activación de NF $\kappa$ B y la expresión de cIAP-2 suprime la muerte celular inducida por TNF $\alpha$  a través de TNFR1, mientras que una mutante de cIAP-2 carente del dominio RING inhibe la inducción de NF $\kappa$ B por TNF y aumenta la letalidad de TNF (Chu *et al*, 1997).

Por otro lado, se ha mostrado que varios miembros de la familia de las IAPs regulan la apoptosis de manera independiente de caspasas a través de la ruta de transducción de señales de la proteína activada por mitógeno (MAP) Jun cinasa 1 (JNK1) (Sanna *et al* 2002; Nachmias *et al*, 2004). JNK fosforila a c-jun y así, incrementa su actividad transcripcional. Además, se ha reportado que JNK activa a otros factores transcripcionales como ATF-2, Elk-1, p53 y c-myc. El papel de JNK en la activación de la muerte celular ha sido objeto de debate; comenzando con la propuesta de no tener ningún papel en la muerte celular, de tener actividad proapoptotica, o bien, de ser antiapoptotico. Asimismo, la activación de JNK regula y aparentemente es regulada por NF $\kappa$ B (Nachmias *et al*, 2004). NAIP, XIAP y Livin son capaces de activar JNK1, mientras que cIAP-1, cIAP-2 y Survivina no lo hacen (Nachmias *et al*, 2004).

XIAP interactúa con el receptor de la proteína morfogenética del hueso (BMP) tipo 1 (Yamaguchi *et al*, 1999) y al receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tipo 1 (Fig. 7b; Birkey Reffey *et al*, 2001). La interacción de XIAP con el receptor a BMP ocurre a través de su dominio RING, mientras que BIR se une a TAB1, un cofactor de TAK1 (cinasa MAP3 que participa en la cascada de señalización, por debajo de BMP) (Yamaguchi *et al*, 1999; Nachmias *et al*, 2004).

Por su parte, hay tres rutas de señalización que pueden activarse en respuesta a TGF- $\beta$  (transcripción dependiente de NF $\kappa$ B, de JNK y de SMAD) y XIAP ha mostrado activar las tres (Birkey Reffey *et al*, 2001). NAIP y Livin son capaces de activar selectivamente a JNK1, probablemente por interacción con



**Figura 7. Participación de las IAPs en la transducción de señales.** a) La intervención de cIAP-1 y -2 en la ruta de señalización intracelular de los receptores TNFR-1 y 2. Las cIAP-1 y -2 se une indirectamente al TNFR2 a través de su interacción con TRAF-1 y 2. TRADD, proteína con dominio de muerte asociada al TNFR. b) Contribución de la XIAP en la transducción de la señal del receptor TGF- $\beta$ . La XIAP se asocia con el receptor TGF- $\beta$  (entre otros), a Tak1 y a Tab1. Ver el texto para más detalles (Modificado de Salvesen y Duckett; 2002).

TAB1 y TAK1 (Nachmias *et al*, 2004). Se ha descrito que la expresión de mutantes inhibitorias de TAK1 o JNK1 reducen la capacidad de XIAP, NAIP o Livin de suprimir la muerte apoptótica inducida por ciertos estímulos, así como TNF- $\alpha$  y caspasa-1, pero no por otros (Sanna *et al* 2002; Nachmias *et al*, 2004). Además, XIAP induce la activación de NF $\kappa$ B, promoviendo de esta manera la supervivencia celular. Dicha activación de NF $\kappa$ B se inhibe en presencia de TAK1 catalíticamente inactiva (Hofer-Warbinek *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004). De este modo, parece ser que las IAPs están involucradas en la transducción de señales mediada por JNK, especialmente en el contexto de una estimulación inflamatoria, y que este efecto es de supervivencia. Así, el debate es si las IAPs inducen o inhiben la activación de JNK (Nachmias *et al*, 2004).

### 1.2e Papel de las IAPs en la Supervivencia Neuronal

En células neuronales, se ha sugerido que las IAPs pueden ser importantes

en la protección ante el daño neuronal, como el que ocurre en un cuadro isquémico, y en la sobrevivencia de neuronas que se observa por acción de agentes tróficos. Particularmente, se ha descrito que la estimulación de neuronas sensoriales y simpáticas en cultivo con el factor de crecimiento neuronal (NGF), induce una expresión rápida de ITA (homólogo de pollo de cIAP-2). En dichos cultivos, la sobreexpresión de ITA promueve sobrevivencia neuronal en ausencia de NGF. Por el contrario, la expresión del RNA antisentido de la IAP, neutraliza el efecto trófico de NGF (Sendtner, *et al*; 2000).

Las neuronas simpáticas tienen la capacidad de activar alternativamente dos rutas de muerte dependientes de caspasas cuando se les priva de NGF. La presencia de ambas rutas puede estar implicada en asegurar el adecuado desarrollo del sistema nervioso. Estas neuronas sufren una muerte celular dependiente de caspasa-2 ante la privación del factor trófico. En este caso, la ruta dependiente de caspasa-9 se encuentra suprimida, presumiblemente por MIAP-3 (homólogo de ratón de XIAP). Sin embargo, las neuronas carentes de caspasa-2 mueren por una ruta dependiente de caspasa-9 mostrando además un incremento en la expresión de Smac (Troy, *et al*; 2001).

Por otro lado, mientras que la mayoría de las células no neuronales mueren de forma dependiente de la liberación de citocromo c al citosol; las neuronas simpáticas son resistentes a la inyección de citocromo c. Se sabe que la XIAP regula la activación de caspasas después de la liberación de citocromo c en neuronas simpáticas. Esto explica por qué las neuronas deficientes de XIAP mueren rápidamente con citocromo c citosólico. Por su parte, la liberación de Smac endógeno no es suficiente para evitar la resistencia dependiente de XIAP de las neuronas simpáticas. La remoción de la inhibición por XIAP es necesaria y suficiente en la activación de caspasas dependiente de citocromo c en neuronas

simpáticas (Potts, *et al*; 2003).

En el caso de las motoneuronas, la XIAP y NAIP, pero no cIAP-1, están involucradas en la respuesta intracelular ante el factor neurotrófico derivado de glia (GDNF). En ratas neonatas, GDNF regula los niveles endógenos de XIAP y NAIP en motoneuronas después de la axotomía del nervio ciático. La inhibición de XIAP y NAIP previene el efecto neuroprotector de GDNF. Lo anterior sugiere que estas IAPs son esenciales en la señalización intracelular de GDNF para la sobrevivencia de motoneuronas (Perrelet, *et al*; 2002). Por lo demás, ocurre una muerte apoptótica en motoneuronas de ratas neonatas pero no en adultas después de una lesión de un nervio periférico. Durante el desarrollo postnatal de la médula espinal se observa un incremento en la expresión de XIAP, NAIP y cIAP-2 y se inicia la expresión de cIAP-1 mientras que la de XAF1 disminuye. Después de una axotomía del nervio ciático, en ratas neonatas hay una pérdida significativa de las IAPs en motoneuronas dañadas, mientras que en el adulto hay una disminución moderada. La sobreexpresión de XAF1 transfectada en motoneuronas adultas abate totalmente la resistencia natural de éstas células a la axotomía (Perrelet, *et al*; 2004).

Ratones carentes de NAIP1 muestran un desarrollo normal. Sin embargo, en estos animales se reduce notablemente la sobrevivencia de neuronas piramidales de hipocampo después de un daño límbico inducido por ácido kaínico. A pesar de que NAIP1 parece no ser necesaria para el desarrollo normal del ratón, la expresión de NAIP1 endógena se requiere para la sobrevivencia neuronal en condiciones patológicas (Holcik, *et al*; 2000b). Por su parte, el tratamiento con bajas concentraciones de N-metil-D-aspartato (NMDA) incrementa los niveles de XIAP en neuronas hipocampales en cultivo, mientras que reduce los niveles de mRNA y la proteína de caspasa-3. El tratamiento con NMDA también inhibe la activación de caspasa-3 y las neuronas son más resistentes a la muerte causada por altas

concentraciones de glutamato y estaurosporina (Korhonen, *et al*; 2004).

En el caso particular de pacientes con Síndrome de Down (SD), se han observado niveles reducidos del mRNA de NAIP en fetos de 23 semanas de gestación, así como de los niveles de la proteína en cerebros de SD adultos. Especialmente, se ha demostrado una reducción en los niveles de NAIP en la corteza occipital de pacientes SD adultos que presentan neurodegeneración tipo Alzheimer (Seidl, *et al*; 1999).

## II. ANTECEDENTES

Durante el desarrollo, se ha observado que ocurre un proceso de muerte masiva en ciertas poblaciones del sistema nervioso (SN) (Oppenheim, 1991). Recientemente, se ha determinado que la muerte que ocurre bajo estas condiciones es de naturaleza apoptótica y que está finamente regulada en tiempo y espacio ya que juega un papel crítico en la morfogénesis y sinaptogénesis del SN (Kuida *et al*, 1996). Las neuronas requieren de la presencia de factores tróficos tanto para la sobrevivencia como para la diferenciación (Balázs *et al*, 1988; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), la migración (Komuro y Rakic, 1993) y la sinaptogénesis (Bloch y Pumplin, 1988). Tanto las aferencias en general como diversos factores derivados de las células gliales han mostrado ser importantes en la regulación y sobrevivencia de neuronas en desarrollo (Oppenheim, 1991).

La dependencia a factores tróficos tanto de los diferentes tipos neuronales como de las células gliales es importante en diferentes etapas del desarrollo. Las señales tróficas provienen no solo de los factores neurotróficos clásicos, sino también de otros factores de crecimiento de diversas familias de proteínas e incluso de la liberación de neurotransmisores por las terminales aferentes, y de la actividad eléctrica de las células vecinas (de la Rosa y de Pablo, 2000). La muerte celular afecta a las células precursoras neuronales y neuroblastos jóvenes en etapas tempranas del desarrollo.

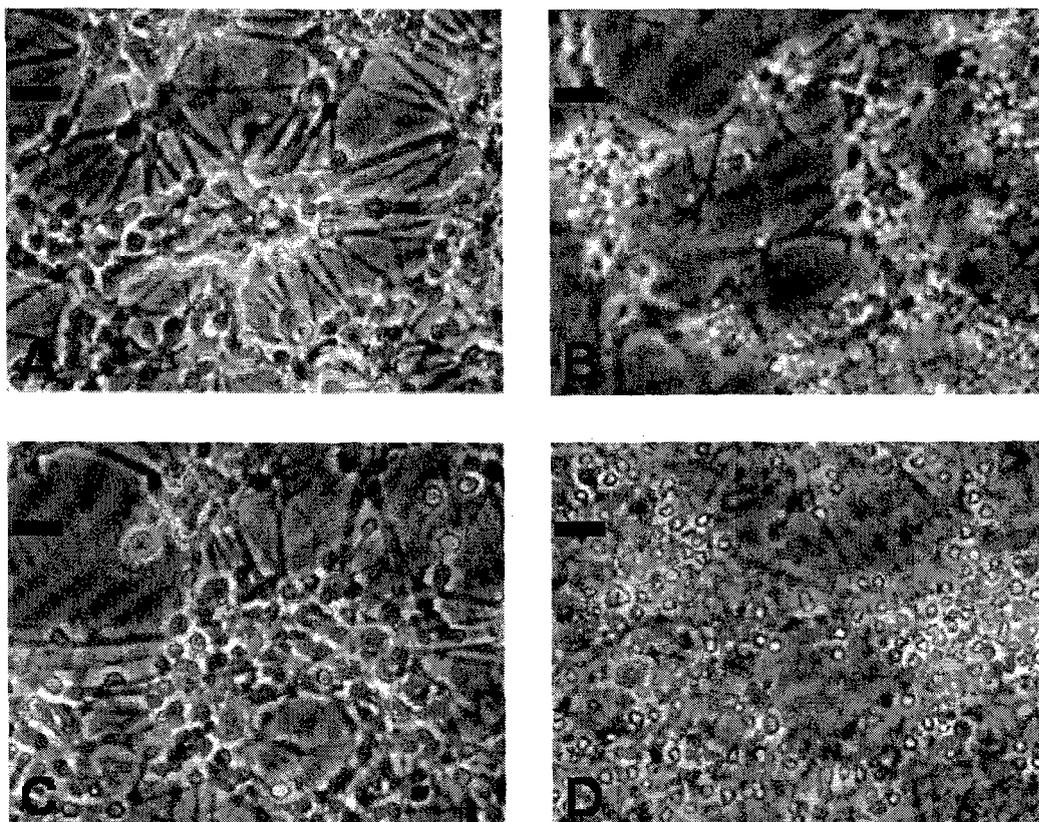
Los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) se han usado como modelo para estudios de muerte apoptótica. En esta preparación se ha demostrado que la despolarización crónica con KCl (25 mM) o la estimulación con NMDA (150  $\mu$ M), un agonista de un subtipo de receptores a glutamato, promueve la sobrevivencia y la diferenciación de NGC (Gallo *et al*, 1987; Balázs *et al*, 1988;

Morán y Patel, 1989; Alavez *et al*, 1996; Morán *et al*, 1996; Balàzs *et al*, 1998; Morán *et al*, 1999) (Fig. 8). Así, el glutamato puede ejercer un efecto trófico sobre las NGC que parece estar modulado por los receptores tipo NMDA (Gallo *et al*, 1987; Balàzs *et al*, 1988; Balàzs *et al*, 1992; Burgoyne *et al*, 1993; Morán *et al*, 1999).

Recientemente, se ha demostrado que el tipo de muerte que se observa en NGC en cultivo que se mantienen en condiciones no despolarizantes (5 mM KCl) es de naturaleza apoptótica y que las condiciones despolarizantes producidas por el KCl (25 mM) y la estimulación de los receptores tipo NMDA pueden retardar de manera sensible este proceso (D'Mello *et al*, 1993) (Fig. 8). Sin embargo, este efecto requiere que las células sean estimuladas al menos durante 5-7 días *in vitro* (DIV) a partir del 2 DIV (Morán *et al*, 1996). Se ha sugerido que la diferenciación y sobrevivencia promovidas por el NMDA en NGC en cultivo, mimetiza el efecto de la activación de los receptores a glutamato de estas células a través de las fibras musgosas provenientes de los núcleos pontinos, en periodos específicos del desarrollo cerebelar (Balàzs *et al*, 1988; Morán *et al*, 1996). Asimismo, aunque se conoce el mecanismo general de acción de la estaurosporina (STS) como un inhibidor de proteínas cinasas, se ignora la forma particular en la que induce apoptosis. La STS se ha empleado ampliamente como inductor de apoptosis neuronal asociada a la activación de caspasas.

En los cultivos de NGC se ha examinado la expresión endógena de cuatro miembros de la familia de las IAPs (Simons *et al*, 1999): XIAP, IAP1 de rata (RIAP1; homólogo de cIAP-2), IAP2 de rata (RIAP2; homólogo de cIAP-1) y NAIP. Las NGC expresan niveles significativos de la proteína y del mRNA de RIAP2, pero no se detecta la expresión de RIAP1, NAIP y XIAP. Los niveles de RIAP2 no cambian cuando a las células se les indujo muerte por la remoción de condiciones

despolarizante de potasio (25 mM KCl) (Simons *et al*, 1999).



**Figura 8. Fotos representativas de NGC en cultivo.** NGC inmaduras, obtenidas de ratas de 8 días postnatales cultivadas 5-7 días *in vitro* (DIV) en un medio con 25 mM KCl (K25) sobreviven (A). Pero si dichas células se cultivan de 5-7 DIV en un medio con 5 mM KCl (K5), las células mueren (B). La estimulación con NMDA 150 mM (C) es capaz de inducir la sobrevivencia de estas células. Sin embargo, las células transferidas de un medio con K25 a uno con K5, también mueren (D). La barra indica 30  $\mu$ m de largo.

Por su parte, la sobreexpresión de algunas IAPs protege a las NGC de algunos estímulos apoptóticos. Simons y colaboradores (1999) describen un retardo en la muerte apoptótica de NGC en condiciones no despolarizantes (5 mM KCl) cuando se induce la expresión de XIAP, hIAP-1, hIAP-2 y NAIP. Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de la XIAP humana en cultivos primarios de NGC protege de la muerte apoptótica inducida no sólo por la remoción aguda de condiciones despolarizantes de potasio, sino también por la privación de suero

(Eldadah *et al*, 2000). Sin embargo, cuando a las NGC en cultivo se les da un estímulo apoptótico excitotóxico, la sobreexpresión de XIAP, hIAP-1, hIAP-2 y NAIP no protege a estas células de la muerte (Simons *et al*, 1999).

Hasta ahora no ha quedado clara la participación de las IAPs en los procesos de sobrevivencia que se observan en las NGC cuando se les cultiva en condiciones despolarizantes de alto potasio (KCl, 25 mM) o cuando son estimuladas con NMDA.

Por otro lado, es sabido que la pérdida del control del ciclo celular es un factor importante en la progresión de tumores. Se ha encontrado que moléculas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 y de las IAPs juegan un papel relevante en la sobrevivencia y la subsecuente proliferación de las células tumorales. Hasta ahora los reportes más frecuentes de la participación de las IAPs en cáncer son referentes a la expresión de la survivina. La expresión alterada de la survivina parece ser un evento común asociado a la patogénesis de la mayoría de los cánceres humanos. La reducción en la expresión de la survivina causa sensibilización apoptótica a drogas anticancerígenas en algunas líneas de células tumorales, implicando que la expresión de la survivina puede ser importante para la sobrevivencia celular y quimioresistencia en carcinomas (Ambrosini *et al*, 1998).

Particularmente, en los tumores derivados de células del SN, así como neuroblastoma, se encuentran niveles altos de moléculas antiapoptóticas como Bcl-2 y survivina. El neuroblastoma es un tumor embrionario de células neuroectodermales derivadas de la cresta neural, que se manifiesta en la infancia y que se destina a la médula adrenal y al sistema nervioso simpático.

Otro tumor derivado del SN es el meduloblastoma, un tumor embrionario maligno e invasivo del cerebelo que se manifiesta principalmente en la infancia y que tiene una tendencia inherente a metástasis vía el líquido cefaloraquídeo. Por dichas características, es importante identificar los factores que determinan la

sobrevivencia y progresión de este tipo de tumores.

Hasta el momento es muy poco lo que se sabe de la participación de las IAPs en la sobrevivencia de las células de tumores neurales de humano y de como estas moléculas pueden de alguna forma proteger a dichos tumores de los tratamientos convencionales dirigidos contra estos tipos de cánceres.

Se ha visto que existe una participación diferencial de los miembros de esta familia dependiendo del tipo de célula tumoral. En el caso de la línea de neuroblastoma humano MSN, usando oligonucleótidos antisentido contra la survivina, se induce un tipo de muerte celular independiente de caspasas con un incremento en los niveles de XIAP y en la traslocación del factor inductor de apoptosis (AIF), de la mitocondria al núcleo (Shankar *et al*, 2001). En contraste, cuando se le da el mismo tratamiento a la línea de oligodendroglioma TC620, se incrementa la cantidad de células en proceso de muerte dependiente de caspasas (Shankar *et al*, 2001).

Por lo anterior, se observa que moléculas reguladoras de apoptosis como las IAPs pueden modular procesos de sobrevivencia-muerte tanto en células en diferenciación (NGC) como en células tumorales. Sin embargo, la importancia y los mecanismos por los cuales esto ocurre no están claros hasta el momento, lo que es crucial por sus implicaciones en el tratamiento de tumores del SN. Basados en estos antecedentes, en este trabajo se exploró el papel de los miembros de la familia de las IAPs en la sobrevivencia de NGC en cultivo y de células de líneas celulares derivadas de tumores del SN.

### **III. HIPÓTESIS**

En condiciones fisiológicas, las IAPs modulan la sobrevivencia de las NGC. Cuando hay una alteración en la expresión de estas moléculas se afectará la muerte/sobrevivencia celular.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Determinar la participación de moléculas de la familia de las IAPs en el proceso de sobrevivencia de NGC y de células tumorales.

#### **Objetivos Particulares**

- Determinar los niveles basales de las IAPs en NGC, meduloblastoma y neuroblastoma.
- Estudiar los cambios en la expresión de IAPs en NGC, meduloblastoma y neuroblastoma al inducir muerte con 5 mM de KCl o estaurosporina.

## **V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **5.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE NGC**

Se hicieron cultivos primarios de neuronas de cerebelo de ratas Wistar de 7 días de nacidas de acuerdo a la técnica descrita por Morán y Patel (1989). Se utilizó un medio de cultivo de Eagle suplementado con suero fetal bovino (10 %) inactivado por calor, 25 mM de KCl (K25), 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. La densidad final de los cultivos fue de  $1.5 \times 10^6$  células/ml. Para permitir la adherencia neuronal, las cajas fueron previamente tratadas con 5 µg/ml de poli-L-lisina. Después de 20 h, las células se trataron con citosina arabinosa (10 µM) para impedir la proliferación de células no neuronales. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y aire saturado con vapor de agua (95 %).

Después de 7-8 DIV, las células se sometieron a diferentes tratamientos para inducir muerte apoptótica. Un grupo de células se transfirió a un medio con KCl 5 mM (K5). Otro grupo de células se mantuvo en el medio con altas concentraciones de potasio (K25) y se trató con estaurosporina (500 nM; STS). En ambos protocolos, las células se incubaron diferentes tiempos, se homogenizaron en amortiguador de lisis a 4 °C (Tris-HCl 25 mM pH 7.4; NaCl 50 mM; IGEPAL 2 %; Dodecil sulfato de sodio: SDS 0.2 %; y un cóctel de inhibidores de proteasas). Se determinó la cantidad de proteína en los homogenados con el método de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior evaluación.

### **5.2 CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES**

Se emplearon cultivos de células tumorales provenientes del Sistema

Nervioso. Se utilizó la línea MSN de neuroblastoma (donación de la Dra. Clorinda Arias, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Las células se mantuvieron en un medio RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado (10 %), una solución de aminoácidos no esenciales (1 %; GIBCO) y con 1 % de una solución que contiene 10 mM de L-glutamina, 47 mM de L-serina y 38 mM de L-asparagina. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) y aire saturado con vapor de agua (95 %). Cuando los cultivos llegaron a confluencia, se les indujo muerte apoptótica con STS (300 nM). Las células se incubaron diferentes tiempos siguiendo el mismo protocolo que el mencionado para las NGC.

### **5.3 OBTENCIÓN DE TEJIDOS**

Ratas Wistar de 8 días postnatales se sacrificaron por decapitación y se removi6 el hipocampo, el cerebelo, parte del cerebro y el bazo. Por otro lado, un rat6n adulto de la cepa C57BL6, igualmente se sacrific6 por decapitaci6n y se extrajo el pulm6n, el coraz6n, el h6gado, el ri6n y el bazo. Los tejidos extra6dos se homogenizaron en amortiguador de lisis a 4 °C (descrito arriba). Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 15 000 g durante 15 min, se recuper6 el sobrenadante, y se determin6 la cantidad de prote6na con el m6todo de Bradford (Bradford, 1976). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior an6lisis.

### **5.4 ANÁLISIS DE RÉPLICAS TIPO WESTERN**

Las prote6nas de los homogenados, tanto celulares como de tejidos, se separaron a trav6s de una electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE por sus siglas en ingl6s; 5-17 %) y fueron transferidas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride; Millipore, Immobilon™-P). La membrana se bloque6 por 1 h con leche descremada al 5 % y

posteriormente se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido contra alguna de las siguientes proteínas: survivina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-10811, dilución 1:75); XIAP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-11426, dilución 1:75); cIAP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-7944, dilución 1:75); cIAP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-7943, dilución 1:75). También se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra cIAP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. sc-1869, dilución 1:75) y el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra survivina (NOVUS Biologicals, Cat. NB5000-238A3, dilución 1:1000). Finalmente las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina; dirigidos contra IgG de conejo (BIO-RAD Laboratories, Cat. 172-1016, dilución 1:15 000; SIGMA, Cat. A-3687, dilución 1:30 000), de cabra (ZyMax, Cat. 81-1622, dilución 1:15 000) y de ratón (SIGMA, Cat. A-9316, dilución 1:30 000) durante 1h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando un substrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina (CDP-Star™, BioLabs, Inc., Cat. N7001S).

A los resultados obtenidos a partir de los inmuensayos tipo Western se les realizó un análisis densitométrico con el programa ImageJ. A los datos numéricos emanados de dicho análisis se les aplicó la prueba estadística de  $t$  de dos poblaciones independientes.

## VI. RESULTADOS

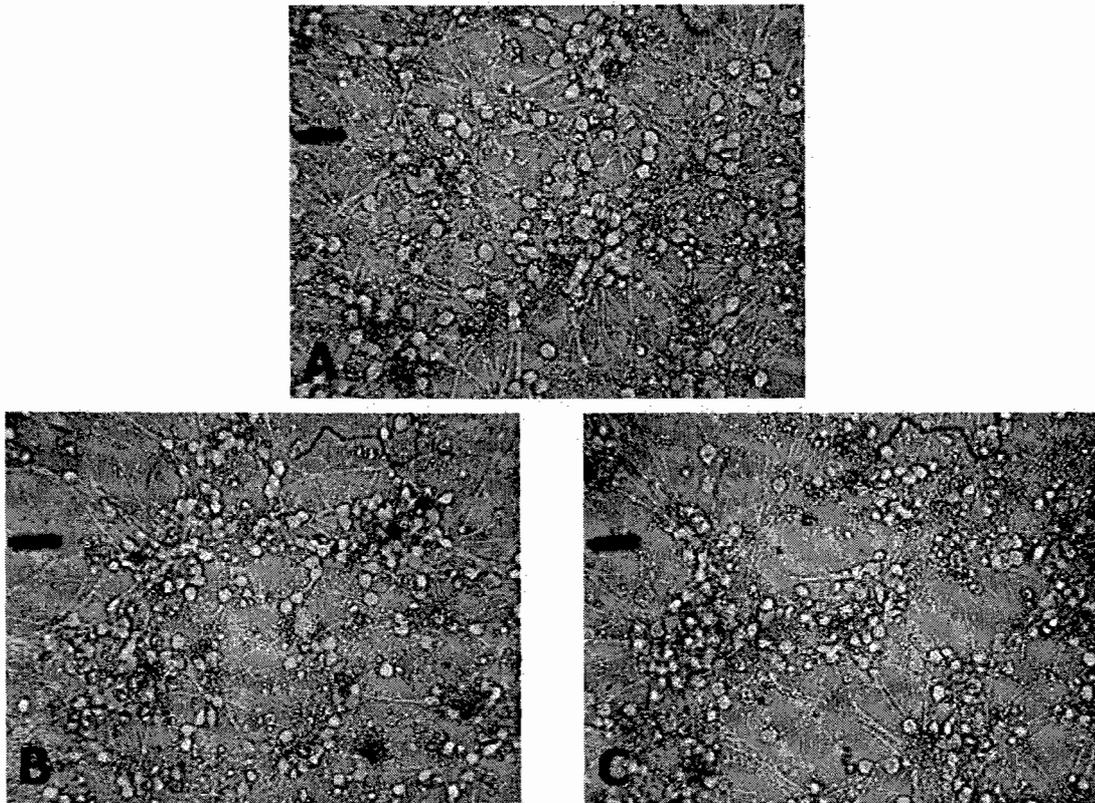
A pesar de que ya Simons y colaboradores (1999) exploraron la expresión basal de algunos de los miembros de la familia de las IAPs en cultivos primarios de NGC, aún no queda clara la expresión las IAPs en dichas células, ni su posible participación en la sobrevivencia. Por esta razón, nosotros analizamos los niveles de expresión de algunas de éstas moléculas (cIAP-1, cIAP-2, XIAP, BRUCE y survivina) en NGC y células MSN bajo condiciones de sobrevivencia y de muerte apoptótica.

### 6.1 NIVELES DE IAPs EN NGC Y MSN

Para determinar los niveles de proteína basal de algunos miembros de la IAPs en NGC, se hicieron cultivos primarios de NGC (Fig. 9) de ratas Wistar de 7 días de nacidas de acuerdo a la técnica descrita por Morán y Patel (1989). En paralelo al análisis de las NGC se emplearon cultivos de diferentes líneas celulares, particularmente la línea de neuroblastoma MSN (Fig. 10), que posee una expresión alterada de ciertas moléculas antiapoptóticas (Shankar *et al*, 2001). Como ya se mencionó, se utilizaron anticuerpos comerciales dirigidos a las IAPs de interés para realizar inmunoensayos.

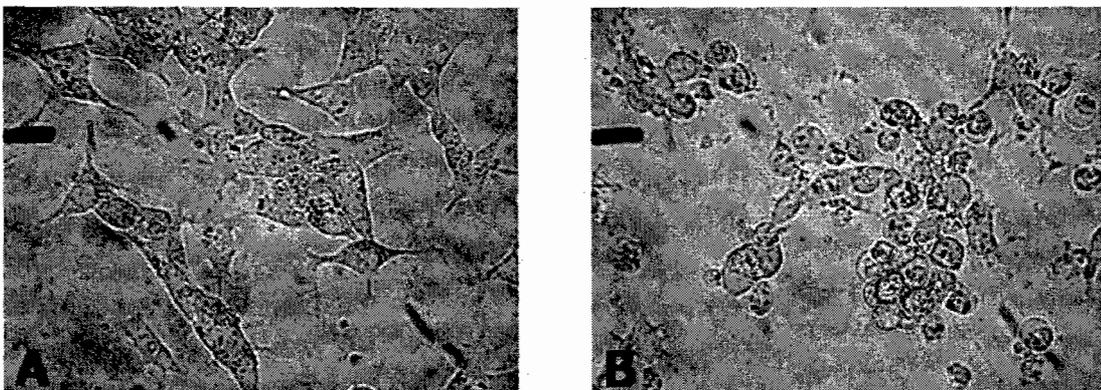
En los homogenados totales de las NGC bajo condiciones de sobrevivencia (K25; Fig. 9A) se detectó la expresión de cIAP-1 (Fig. 11 A y C), cIAP-2 (Fig. 12A), XIAP (Fig. 13A) y survivina (Fig. 15A). En el caso de la survivina los controles positivos son los astrocitos por ser células proliferativas y las mismas células MSN (Shankar, *et al*; 2001), mientras que el control negativo es el bazo, principalmente el bazo del ratón adulto (Fig. 15A). Sin embargo, no se observa expresión de BRUCE

## NGC

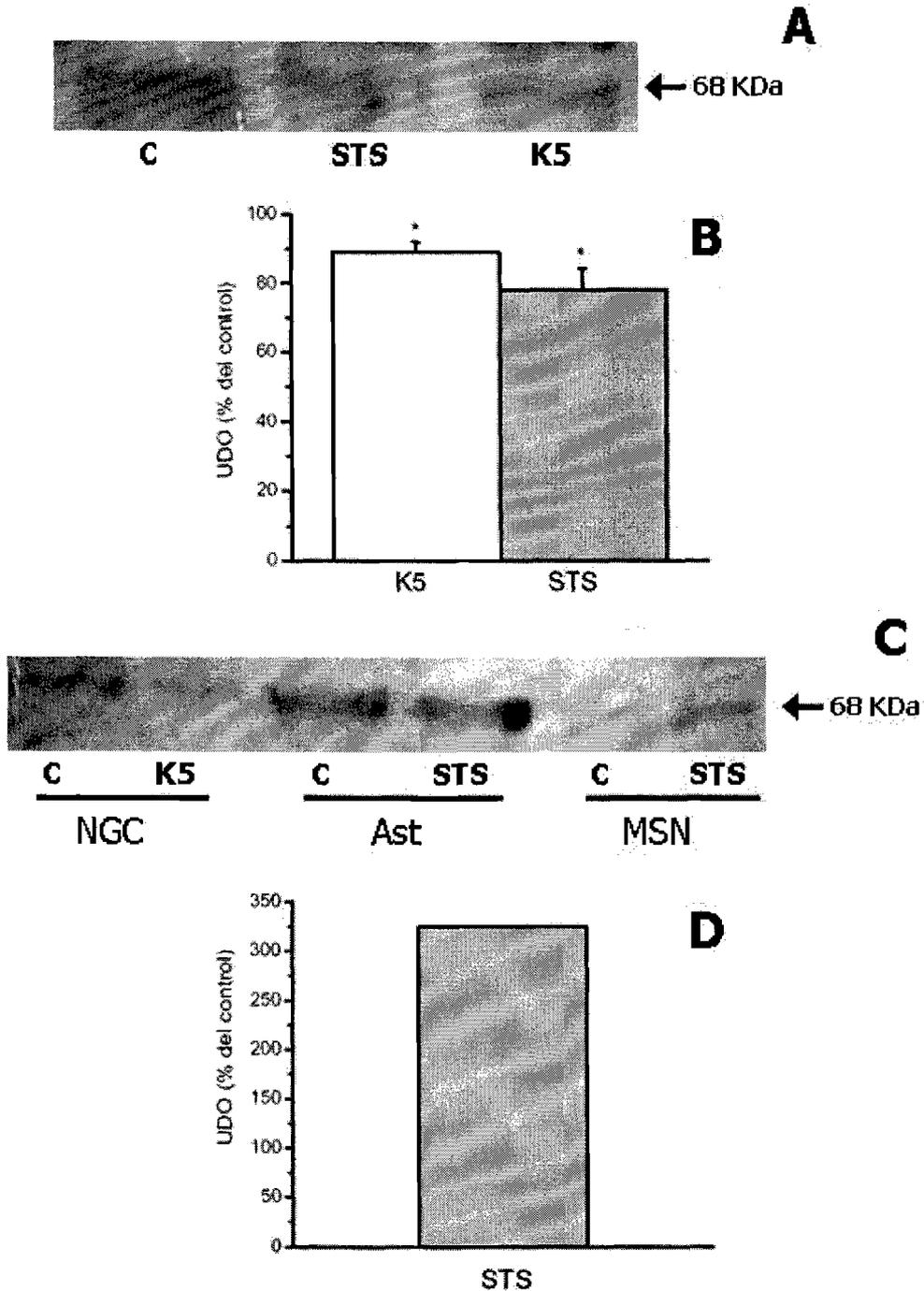


**Figura 9. Fotos representativas de los cultivos de NGC bajo condiciones de supervivencia o muerte.** Fotos obtenidas por microscopía de campo claro de NGC cultivadas por 7 DIV en un medio con 25 mM KCl (K25). A) Cultivo control en estado de supervivencia con un medio con K25. B) Cultivo después de 9 h de haber sido transferido de un medio con K25 a uno con 5 mM de KCl (K5). C) Cultivo estimulado con 500 nM de STS por 9 h. La barra indica 25  $\mu$ m de largo.

## MSN



**Figura 10. Fotos representativas de células MSN en cultivo.** Fotos obtenidas por microscopía de campo claro de células MSN. A) Células control. B) Células tratadas con 300 nM de STS por 10 h. La barra indica 25  $\mu$ m de largo.



**Figura 11. Expresión de cIAP-1 en NGC y células MSN en sobrevivencia y muerte apoptótica.** A) Western blot realizado con homogenados de cultivos primarios de NGC mantenidos por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25) y después de 8-9 h de tratamiento con los inductores de muerte correspondientes. B) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 68 KDa que se observa en la Western blot de A. C) Western blot realizado con homogenados de cultivos primarios de NGC (bajo las mismas condiciones de A), de cultivos primarios de astrocitos (Ast) de 15 DIV y de células MSN con o sin la estimulación con STS por 9 h. D) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 68 KDa que se observa en la Western blot de C, correspondiente a los carriles de MSN. Se observa que las NGC control expresan la IAP y que K5 y STS induce una disminución de dicha expresión (A, B y C). Los controles de las células MSN no expresan la proteína pero la STS induce su expresión (C y D). La flecha en A y C indica una banda de 68 KDa correspondiente al peso de cIAP-1. En todos los casos las condiciones se expresan como: control (C), transferencia a un medio no despolarizante (K5), estimulación con STS (STS). Los valores de las gráficas en B y D son la media  $\pm$  el error estándar y se expresan como el porcentaje con respecto al control de unidades de densitometría óptica (UDO); \*  $p < 0.05$ ,  $n=3$  en B y  $n=2$  en D.

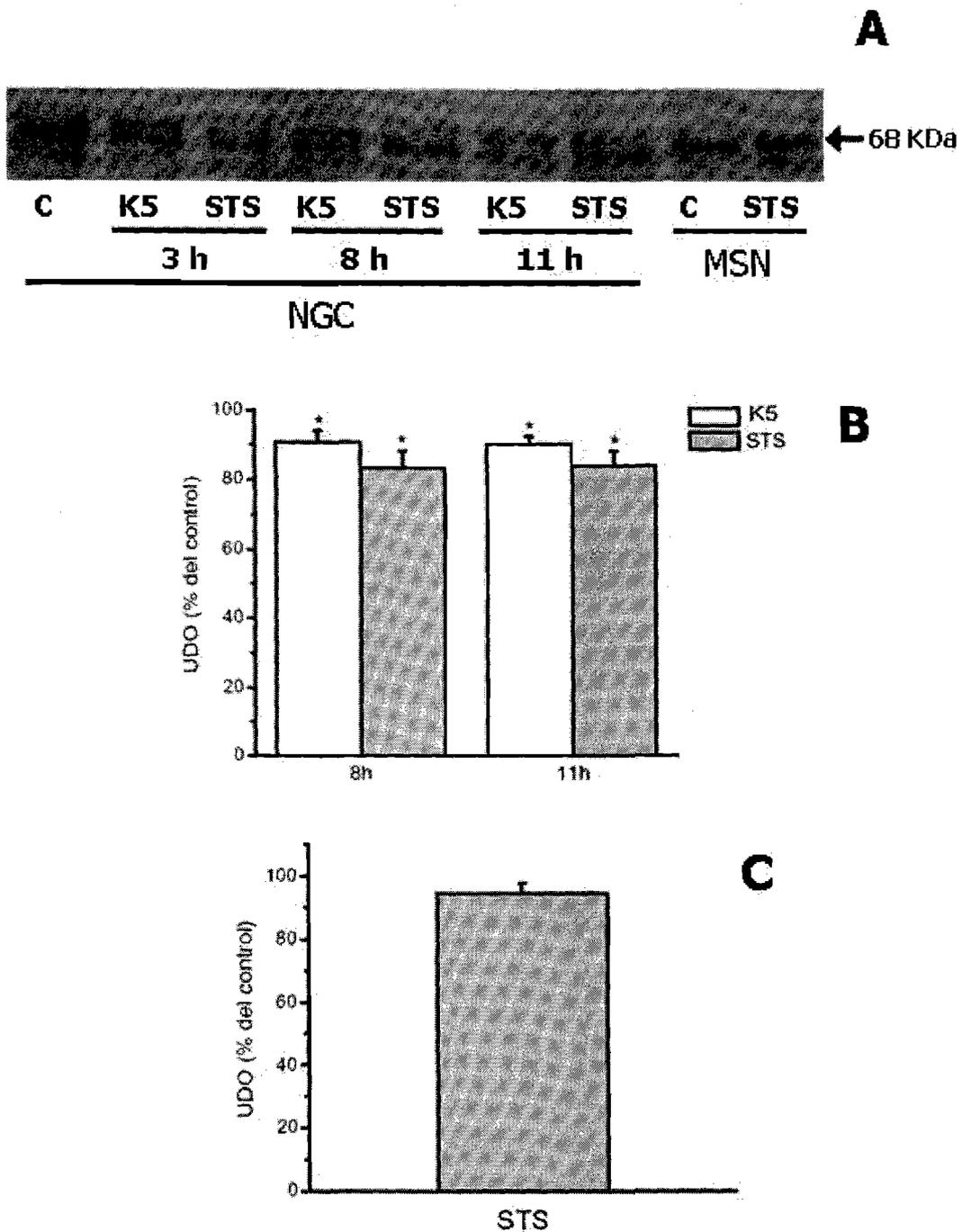
(Fig. 14B); cuyos controles positivos son corazón, cerebro, pulmón y bazo (Hauser *et al*, 1998; Chen *et al*, 1999).

Por su parte, en los inmunoensayos realizados con los homogenados de los cultivos de células MSN bajo condiciones de sobrevivencia (Fig. 10A) se observó la expresión de cIAP-2 (Fig. 12A), de survivina (Fig. 15) y BRUCE (Fig. 14 A y B) pero no de cIAP-1 (Fig. 11C) y XIAP (Fig. 13A).

## **6.2 EFECTO DE LA MUERTE APOPTÓTICA INDUCIDA POR K5 Y STS EN LOS NIVELES DE IAPs EN NGC**

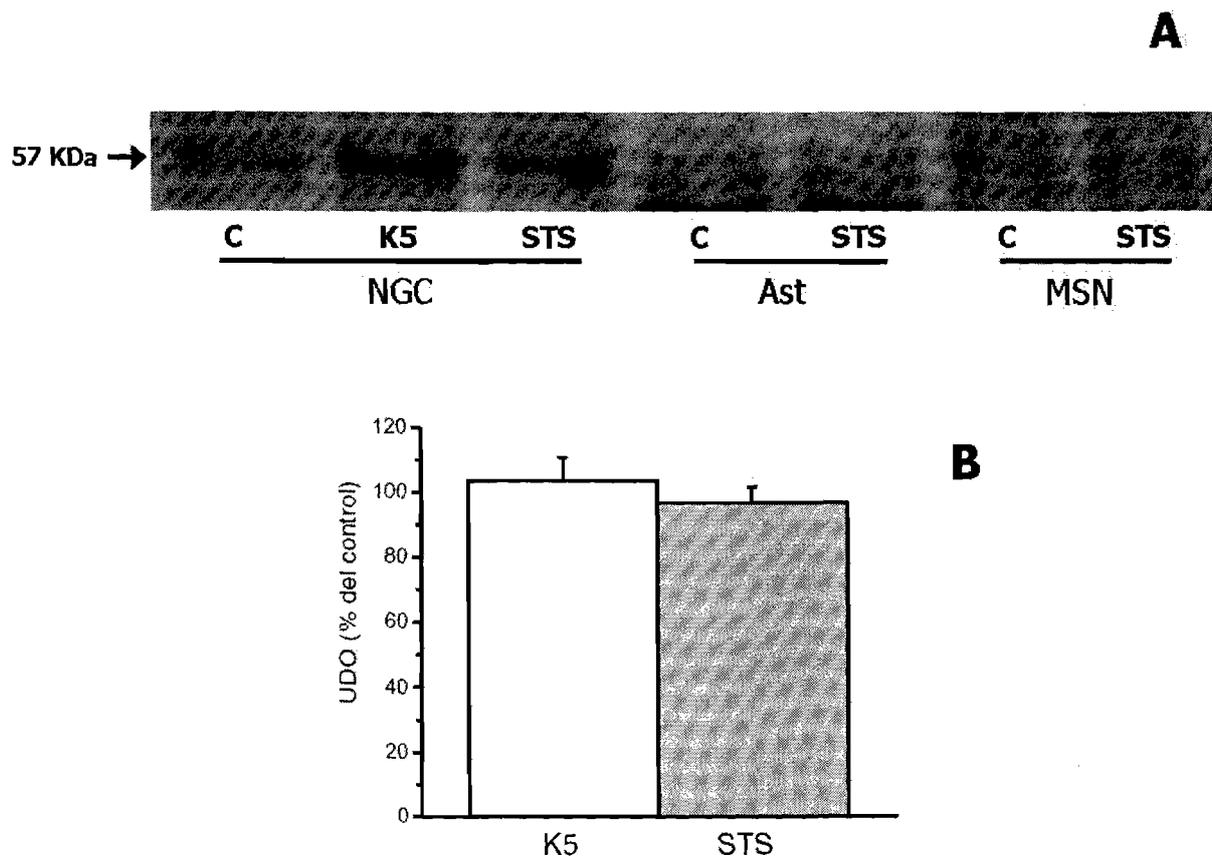
Para medir los niveles de las IAPs en las NGC bajo condiciones de muerte apoptótica, se empleó la transferencia de las NGC de un medio despolarizante (K25) a uno no despolarizante (K5). También se indujo muerte con STS (500 nM). En ambos casos se observó la morfología de las células bajo microscopía de contraste de fases y se confirmó que los cultivos tratados por 24 h con K5 o STS se encontraban en proceso de muerte comparados con los cultivos control. Los cultivos usados para los ensayos de Western blot se tomaron entre las 8-11 h de tratamiento con K5 o STS ya que los picos de activación de caspasas bajo estos tratamientos se observan ya hacia las 8 h. En la figura 9 se muestran micrografías representativas de cultivos tratados con K5 (Fig. 9B) o STS (Fig. 9C) al tiempo en que se tomaron para realizar los inmunoblots.

La muerte de NGC inducida por K5 disminuye, de manera estadísticamente significativa, aproximadamente un 10 % con respecto al control de los niveles de cIAP-1 hacia las 9 h de tratamiento (Fig. 11B) y de cIAP-2 a las 8 h, que se mantiene también a las 11 h (Fig. 12B). Sin embargo, el tratamiento con K5 no induce cambios significativos en los niveles de XIAP (Fig. 13B). Dicho tratamiento tampoco cambia los niveles basales de expresión de survivina (Fig. 15 A y B).



**Figura 12. Expresión de IAP-2 en NGC y células MSN en sobrevivencia y muerte apoptótica.**

A) Western blot realizado con homogenados de cultivos primarios de NGC mantenidos por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25) y después de 3, 8 y 11 h de tratamiento con los inductores de muerte correspondientes. Asimismo con homogenados de células MSN con o sin el tratamiento con STS por 9 h. B) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 68 KDa que se observa en la Western blot de A, correspondiente a los carriles de NGC. C) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 68 KDa que se observa en la Western blot de A, correspondiente a los carriles de MSN. Se observa que las NGC control expresan la IAP y que K5 y STS induce una disminución de dicha expresión (A y B). Los controles de las células MSN expresan la proteína y la STS no cambia la expresión de la IAP (A y C). La flecha en A indica una banda de 68 KDa correspondiente al peso de IAP-2. En todos los casos las condiciones se expresan como: control (C), transferencia a un medio no despolarizante (K5), estimulación con STS (STS). Los valores de las gráficas en B y C son la media  $\pm$  el error estándar y se expresan como el porcentaje con respecto al control de unidades de densitometría óptica (UDO); \*  $p < 0.05$ ,  $n=6$  en B y  $n=4$  en C.



**Figura 13. Expresión de XIAP en NGC y células MSN en sobrevivencia y muerte apoptótica.** A) Western blot realizado con homogenados de cultivos primarios de NGC mantenidos por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25) y después de 9 h de tratamiento con los inductores de muerte correspondientes. Asimismo con homogenados de cultivos primarios de astrocitos (Ast) de 15 DIV y células MSN con o sin el tratamiento con STS por 24 o 9 h, respectivamente. B) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 57 KDa que se observa en la Western blot de A, correspondiente a los carriles de NGC. Se observa que las NGC control expresan la IAP y que K5 y STS no induce en dicha expresión (A y B). Por su parte, en las células MSN no se observa una clara expresión de la proteína y no se observan cambios de expresión por efecto del tratamiento con STS (A). La flecha en A indica una banda de 57 KDa correspondiente al peso de XIAP. En todos los casos las condiciones se expresan como: control (C), transferencia a un medio no despolarizante (K5), estimulación con STS (STS). Los valores de las gráficas en B son la media  $\pm$  el error estándar y se expresan como el porcentaje con respecto al control de unidades de densitometría óptica (UDO); n=3.

En el caso de BRUCE, no se observa que K5 induzca la expresión de estas IAPs en las NGC (Fig. 14B).

Por su parte, la STS produjo la disminución, estadísticamente significativa, con respecto al control de 20% en los niveles de cIAP-1 hacia las 9 h de tratamiento (Fig. 11B) y de 17 % de cIAP-2 a las 8 h, que se mantiene hacia las 11 h (16 %) (Fig. 12B). Pero, como en el caso de la muerte con K5, la STS tampoco induce cambios significativos en los niveles de XIAP (Fig. 13B). En el caso de survivina, aunque se observó una reducción de sus niveles, los datos no son suficientes para determinar si la reducción es estadísticamente significativa (Fig. 15 A y B).

### **6.3 EFECTO DE LA MUERTE APOPTÓTICA INDUCIDA POR STS EN LOS NIVELES DE IAPs EN CÉLULAS MSN**

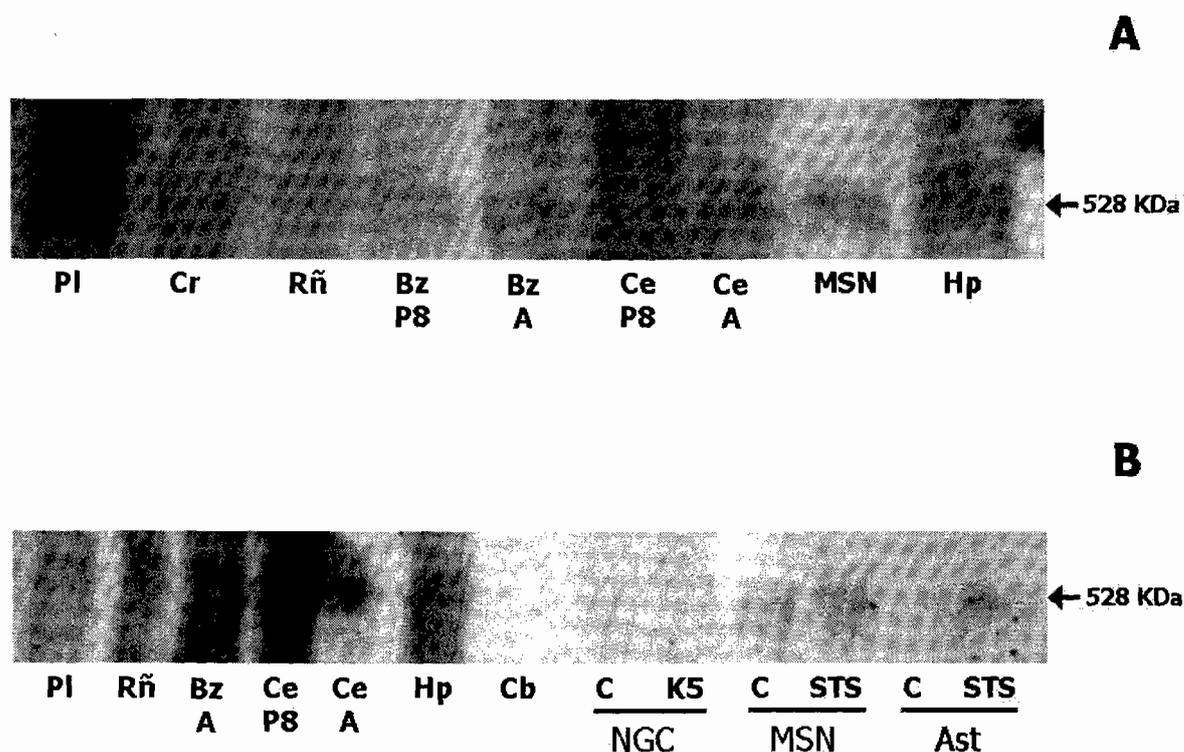
Para medir los niveles de las IAPs en células MSN bajo condiciones de muerte apoptótica, se empleó como inductor de muerte celular la adición de STS (300 nM) al medio de cultivo. Se observó el estado morfológico de las células bajo microscopía de contraste de fases y se confirmó que los cultivos tratados con STS (Fig. 10B) se encontraban en proceso de muerte comparados con los cultivos control.

La muerte apoptótica inducida por la estimulación con STS por 9h, disminuye los niveles de cIAP-2 alrededor de un 5 % con respecto al control, pero dicha disminución no es estadísticamente significativa (Fig. 12 A y C). Además, tampoco se observan cambios en la expresión de XIAP y de BRUCE. Es decir, la STS por un lado, no induce la expresión de la XIAP en las células MSN (Fig. 13A), y por otro lado, no cambia los niveles basales de expresión de BRUCE (Fig. 14B).

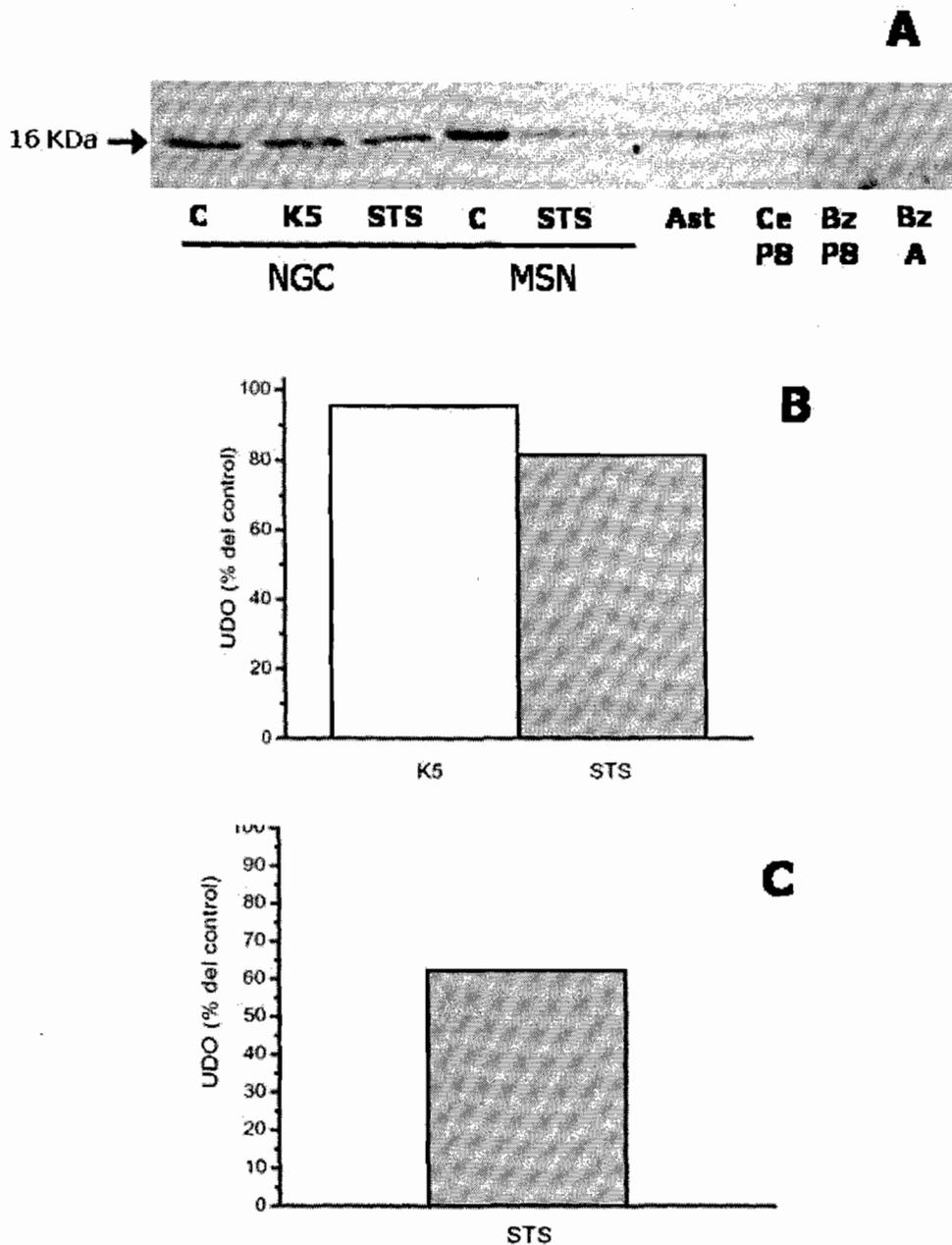
Por su parte, en el caso de la cIAP-1 se observa que la STS induce la expresión de esta IAP (Fig. 11C), elevándose en las células tratadas con STS

aproximadamente 3 veces los niveles de la cIAP-1, comparado con los niveles prácticamente imperceptibles, observados en las células control (Fig. 11D).

En el caso de la survivina, a diferencia de las NGC, en las células MSN se observa un cambio muy claro en los niveles basales de la IAP. Hay una disminución notable de survivina en las células MSN tratadas con STS, alrededor de un 38 % (Fig. 15 A y C).



**Figura 14. Expresión de BRUCE en NGC y células MSN en sobrevivencia y muerte apoptótica.** A) Western blot realizado con homogenados de varios tejidos de rata y ratón (ver Procedimiento Experimental para más detalles) y de células MSN bajo condiciones de sobrevivencia. B) Western blot realizado con homogenados de algunos de los tejidos empleados en A. Asimismo con homogenados de cultivos primarios de NGC mantenidos por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25) y después de 9 h de la transferencia a un medio no despolarizante (K5). Y con homogenados de cultivos primarios de astrocitos (Ast) de 15 DIV y células MSN con o sin el tratamiento con STS por 24 o 9 h, respectivamente. Se observa la expresión de la IAP en los controles positivos (Cr, Ce A, PI y Bz A) y las células MSN (A y B), el tratamiento de dichas células con STS no induce cambios en la expresión de la proteína (B). Por su parte, las NGC control no expresan la IAP y el tratamiento con K5 no induce la expresión de BRUCE (B). La flecha en A y B indica una banda de 528 KDa correspondiente al peso de BRUCE. En todos los casos las condiciones se expresan como: pulmón (PI), corazón (Cr), riñón (Rñ), bazo de una rata de 8 DPN (Bz P8), bazo de un ratón adulto (Bz A), cerebro de una rata de 8 DPN (Ce P8), cerebro de un ratón adulto (Ce A), hipocampo (Hp), cerebelo (Cb), control (C), transferencia a un medio no despolarizante (K5), estimulación con STS (STS).



**Figura 15. Expresión de Survivina en NGC y células MSN en sobrevivencia y muerte apoptótica.** A) Western blot realizado con homogenados de cultivos primarios de NGC mantenidos por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25) y después de 9 h de tratamiento con los inductores de muerte correspondientes. Asimismo con homogenados de cultivos primarios de astrocitos (Ast) de 15 DIV solo bajo condiciones de sobrevivencia y de células MSN con o sin el tratamiento con STS por 9 h. Y con homogenados de algunos tejidos de rata y de ratón (ver Procedimiento Experimental para más detalles). B) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 16 KDa que se observa en la Western blot de A, correspondiente a los carriles de NGC. C) Los resultados obtenidos por el análisis densitométrico de la banda de 16 KDa que se observa en la Western blot de A, correspondiente a los carriles de MSN. Se observa que las NGC control expresan la IAP y que STS induce una disminución de dicha expresión mientras que K5 no cambia los niveles basales (A y B). Los controles de las células MSN expresan la proteína y la STS disminuye notablemente los niveles de la IAP (A y C). La flecha indica una banda de 16 KDa correspondiente al peso de survivina. En todos los casos las condiciones se expresan como: control (C), transferencia a un medio no despolarizante (K5), estimulación con STS (STS), bazo de una rata de 8 DPN (Bz PB), bazo de un ratón adulto (Bz A), cerebro de una rata de 8 DPN (Ce PB). Los controles positivos son Ast y las células MSN; el control negativo es el Bz, principalmente Bz A. Los valores de las gráficas en B y C se expresan como el porcentaje con respecto al control de unidades de densitometría óptica (UDO); n=1.

## VII. DISCUSIÓN

La muerte celular apoptótica participa de manera importante en eventos fisiológicos, como el desarrollo del sistema nervioso, así como en procesos patológicos, como el cáncer. Por lo anterior, resulta necesario entender los mecanismos responsables de la muerte apoptótica. Sabemos que esta muerte está regulada finamente por una variedad de familias de proteínas como las caspasas y las IAPs, entre otras. Particularmente, en el caso de las IAPs aún no queda muy clara su participación en los procesos de sobrevivencia/muerte neuronal.

En este estudio tratamos primeramente de identificar la presencia de algunos miembros de la familia de las IAPs en cultivos primarios de NGC, y posteriormente, nos interesó determinar si ocurrían cambios en la expresión de dichas proteínas ante estímulos apoptóticos como la privación de un soporte trófico (la transferencia de un medio despolarizante, K25, a uno no despolarizante, K5) y la estimulación con STS. En paralelo, trabajamos con una línea celular de neuroblastoma (MSN) a la que se indujo muerte con STS.

En condiciones de sobrevivencia, determinamos una expresión basal de cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina pero no de BRUCE en las NGC, mientras que en las células MSN detectamos la expresión de cIAP-2, BRUCE y survivina y fueron prácticamente indetectables los niveles de cIAP-1 y XIAP. Lo primero que resalta es que hay una expresión diferencial de los diversos miembros de las IAPs en los dos tipos celulares analizados, lo cual puede tener implicaciones fisiológicas en cuanto a la respuesta de estos tipos celulares ante distintos estímulos apoptóticos.

En un estudio previo, Simons y cols. (1999) reportaron en NCG la expresión basal de RIAP2 (IAP2 de rata, homólogo de la cIAP-1 humana), pero no de RIAP1 (homólogo de cIAP-2 humana), XIAP y NAIP. Nuestros resultados difieren en

cuanto a que nosotros si detectamos expresión de cIAP-2 y XIAP. Un punto importante en el reporte de Simons y cols. (1999) es que no emplearon controles positivos ni negativos para ninguna de las IAPs y que los anticuerpos utilizados, en particular para cIAP-2, eran inespecíficos.

Un resultado importante de nuestro estudio fue que los estímulos apoptóticos afectaron diferencialmente los niveles de las distintas IAPs en los dos tipos celulares analizados. El efecto más marcado observado en la inducción de muerte apoptótica de NGC como resultado del tratamiento con K5 o con STS es la disminución significativa con respecto al control (K25) de los niveles de la cIAP-1 y la cIAP-2, mientras que los niveles basales de XIAP, BRUCE y survivina no se vieron afectados de manera significativa por ninguno de los dos estímulos apoptóticos. En el caso de las células MSN se observa que el tratamiento con STS induce de manera evidente la expresión de la cIAP-1, además de una reducción importante de la survivina. En estas células no hubo cambios significativos en los niveles basales de expresión de la cIAP-2, XIAP y BRUCE.

El hecho de que en las NGC sólo detectamos cambios en cIAP-1 y cIAP-2 y que éstos son a la baja, nos sugiere que estas IAPs están involucradas en la sobrevivencia de las NGC bajo condiciones despolarizantes. En relación con esto sabemos que la muerte por K5 está mediada por las caspasas -9 -3 (Morán *et al.*, 1999), mientras que la STS involucra a las caspasas -2, -9 y -3 (Caballero-Benítez y Moran, 2003). Por otro lado, como se mencionó en la introducción, la XIAP y las cIAPs inhiben a las caspasas -3 y -9 (Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004), mientras que la caspasa-2 es resistente a la inhibición por estas IAPs (Ho *et al*, 2005). Además, hacia las 8 h de tratamiento ya se observa una disminución de ambas cIAPs, que coincide temporalmente con la activación de las caspasas-9 y -3 en respuesta a los estímulos apoptóticos. Así, la expresión de las cIAPs podría estar

jugando un papel importante en la sobrevivencia de las NGC inhibiendo a las caspasas-9 y -3.

Desconocemos los factores que provocarían la disminución de las cIAPs en condiciones apoptóticas, aunque el dominio RING (con actividad de E3) podría participar en el proceso. Por otro lado, se sabe que la cIAP-1 y -2 pueden autoubiquitinarse, pero mientras que cIAP-1 induce su propia degradación por el sistema del proteasoma (Yang *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004), la cIAP-2 no sufre ninguna modificación ni se alteran sus propiedades antiapoptóticas (Shin *et al*, 2003). Además, se ha descrito que la cIAP-1 es sustrato de las caspasas-3, -6 y -7, originándose un fragmento que contiene sólo el dominio RING con actividad proapoptótica (Clem *et al*, 2001). Por lo tanto, la propia caspasa-3 mínimamente desinhibida podría fragmentar a cIAP-1 y el fragmento proapoptótico de la IAP podría contribuir al proceso de muerte inducida por K5 y/o STS.

Por otro lado, la expresión de survivina en las NGC puede asociarse a que esta IAP juega un papel muy importante durante la mitosis (Li *et al*, 1999; en Nachmias *et al*, 2004) y las NGC inmaduras de rata sufren *in vivo* una proliferación masiva a los 8-15 DPN (Altman, 1972). De este modo, los cultivos primarios de NGC de 7 DIV (edad usada en este estudio) podrían experimentar una expresión de survivina reflejo de este evento de proliferación. Sin embargo, no queda claro el papel que esta molécula puede estar jugando en la sobrevivencia de estas neuronas.

En relación a la expresión de XIAP, no queda claro el significado de su expresión basal en NGC. El que ninguno de los dos tratamientos apoptóticos haya tenido un efecto muy claro en los niveles de la XIAP sugiere que esta IAP no está implicada de manera directa en la sobrevivencia de las NGC. Considerando que en la muerte por K5 y STS se activan las caspasas -9 y -3, se esperaría que bajo

condiciones de sobrevivencia la XIAP estuviera inhibiendo a esas dos caspasas y la estimulación con K5 y/o STS provocaría la desinhibición de las caspasas por una regulación a la baja de la XIAP. Lo anterior se respalda fuertemente por dos características de la XIAP: su potente acción inhibitoria de las caspasas -3 y -7 (Bartke *et al*, 2004; Hao *et al*, 2004; Shi, 2004); y su participación en el apoptosoma junto con Apaf-1 y caspasa-9 (Hill *et al*, 2004). Aún así, la XIAP no parece estar implicada en la acción mediada por K5 y STS.

Así, la expresión de XIAP bajo las condiciones estudiadas podría estar asociada a otras funciones. Por un lado, se sabe que la XIAP está relacionada con la señalización iniciada por la activación de los receptores a BMP y TGF- $\beta$  (Yamaguchi *et al*, 1999; Birkey Reffey *et al*, 2001). XIAP activa a JNK1 y hay discusión de si esto se relaciona con la sobrevivencia celular (Nachmias *et al*, 2004). Por otro lado, XIAP también puede estar involucrada en la mitosis celular. Recientemente se identificó en la cinasa Chk1 un dominio IBM similar a los que tienen caspasa-9 y Smac (Galvan *et al*, 2004). Por medio del dominio IBM de Chk1, esta cinasa interactúa con el dominio BIR3 de XIAP y de cIAP-1. La presencia celular del complejo Chk1-XIAP se restringe a la mitosis durante la prometafase (Galvan *et al*, 2004). Así, la expresión de XIAP observada en NGC puede deberse, como en el caso de la survivina, a los requerimientos de estas células en alguna de estas situaciones.

Dohi y colaboradores (2004) describieron una asociación entre XIAP y survivina mediante sus dominios BIR, lo que incrementa la estabilidad de XIAP y la protege de la ubiquitinación y degradación. Este grupo de trabajo también describe que un estímulo apoptótico induce la formación del complejo survivina-XIAP (Dohi *et al*, 2004). De este modo, cabe la posibilidad de que survivina y XIAP, que se expresan simultáneamente en las NGC, se estén asociando y de este modo se está

inhibiendo su degradación.

También existe la posibilidad de una redistribución de XIAP después de los estímulos apoptóticos lo que podría reducir la acción de esta IAP en los lugares donde se activan las caspasas. La redistribución de XIAP puede resultar, por un lado, de eventos de monoubiquitinación, y por otro lado por el secuestro de XIAP por sus reguladores negativos. En el primer caso, se sabe que la monoubiquitinación no conduce a degradación proteolítica (Yang y Yu, 2003). Lotocki y colaboradores (2003) observaron que XIAP presenta diferentes patrones de localización en neuronas, dependiendo de si las células son sanas, apoptóticas o necróticas. Estos autores observaron que después de un trauma cerebral, ocurre una redistribución de XIAP, lo cual podría estar asociado a una monoubiquitinación (Yang y Yu, 2003).

En el segundo caso, la XIAP podría estar siendo secuestrada por proteínas como XAF-1 y Smac. XAF-1 se une a XIAP inhibiendo su actividad como inhibidora de caspasas y la secuestra en el núcleo (Liston *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). No sabemos si en las NGC se expresa XAF-1, pero está reportado que se expresa ubicuamente en los tejidos normales (Liston *et al*, 2001) y se ha identificado en motoneuronas (Perrelet, *et al*, 2002; Perrelet, *et al*, 2004). La XAF-1 podría reducir la inhibición de las caspasas -9 y -3 efectuada por XIAP, secuestrándola en el núcleo sin inducir una disminución en sus niveles.

Por otro lado, Smac que también se une a XIAP e inhibe su actividad antiapoptótica, podría estar secuestrando a XIAP sin inducir su degradación. En el grupo de trabajo se ha identificado la expresión basal de Smac en las NGC (datos no publicados). Se ha visto la presencia de Smac madura en el citosol de las NGC cultivados en K25, es decir, en condiciones de sobrevivencia. Sin embargo, sus niveles no incrementan con ninguno de los dos estímulos apoptóticos usados en

este estudio. Por lo tanto, no esperaríamos un efecto proapoptótico muy importante de Smac bajo estas condiciones. Quizá XIAP esté contrarrestando el efecto que podría tener Smac madura en el citoplasma sobre las otras IAPs en las NGC bajo condiciones de sobrevivencia.

Por otro lado y en relación a la expresión de survivina y de XIAP en células de neuroblastoma MSN, confirmamos los datos obtenidos por Shankar y cols. (2001). Así, en estas células encontramos niveles altos de survivina, en congruencia con el hecho ya comentado en relación a que la sobreexpresión de survivina es un factor relevante en la progresión tumoral asociado a la mitosis celular. La importancia de survivina en la sobrevivencia de dichas células se refleja en el hecho de que el tratamiento apoptótico provoca una dramática disminución en los niveles de ésta IAP. El grupo de Shankar (2001) también observó que en condiciones basales las células MSN no expresan niveles altos de XIAP, lo cual fue confirmado en este estudio. Además, no observamos cambios en los niveles basales de XIAP después de la estimulación con STS. Estas diferencias en los cambios de expresión de la XIAP producidos por estímulos apoptóticos, puede deberse a mecanismos intracelulares diferentes ocasionados por los dos distintos tratamientos.

Con respecto a la inducción de cIAP-1 por STS observada en células MSN podría sugerirse que ocurre en respuesta a un mecanismo compensatorio por la disminución de survivina. Sin embargo, la inducción de la expresión de cIAP-1 no es suficiente para rescatar estas células de la muerte apoptótica inducida por STS. Algo similar observaron Shankar y colaboradores (2001) cuando redujeron la expresión basal de survivina y tampoco se rescató a las células de la muerte apoptótica, lo cual sugiere que estas células tienen mecanismos emergentes para mantener su sobrevivencia después de enfrentarse a estímulos dañinos, aunque no

sean tan eficientes para todos los casos. Lo anterior se refleja en la resistencia natural que presentan las células tumorales, incluyendo a las derivadas de tumores de neuroblastoma, a diversos agentes nocivos.

Se ha reportado que las cIAPs pueden presentar una localización no solo citoplásmica, sino también nuclear y mediada por las TRAFs, que las mantienen en el citoplasma, y CRM1, que las exporta al núcleo (Vischioni *et al*, 2004). Sin embargo, no está claro el posible papel antiapoptótico de las cIAPs en el núcleo principalmente en el caso de la cIAP-2, ya que como se menciona arriba, cIAP-1 puede estar involucrada, al menos indirectamente, en la mitosis celular por su capacidad de interactuar con Chk1 (Galvan *et al*, 2004). De hecho, recientemente se describió una localización preferentemente nuclear para cIAP-1 y se vio una colocalización de cIAP-1 y de Survivina en los microtúbulos durante la telofase (Samuel *et al*, 2005). Quizá, a pesar de que se incrementan los niveles de cIAP-1 en la línea MSN después del tratamiento con STS, ésta IAP podría movilizarse al núcleo y de esta forma no presentar un papel antiapoptótico importante.

En el caso de la cIAP-2 y de BRUCE, parece que éstas IAPs no están involucradas en la sobrevivencia de las células MSN ya que a pesar de que se expresan de manera basal, sus niveles no se modifican por la adición de STS. Por su parte, la cIAP-2 podría presentar en estas células una localización nuclear y de este modo no tener un efecto antiapoptótico muy importante, ya que como se menciona arriba, no está claro el papel de las cIAPs en el núcleo.

Finalmente, el papel de BRUCE en la sobrevivencia celular constituye un tema oscuro dado que se conoce muy poco de esta IAP. Aunque está claro que su sobreexpresión tienen efecto antiapoptótico (Lotz *et al*, 2004), visiblemente asociado a su capacidad de inhibir caspasas (Bartke *et al*, 2004; Hao *et al*, 2004), no se conoce la importancia real de su expresión celular. Hasta el momento no se

sabe el por qué de su localización intracelular, asociada periféricamente a la membrana de la red trans-Golgi y a estructuras vesiculares (Hauser *et al*, 1998), además de otras posibles funciones celulares de la IAP. En relación a esto, sólo podemos sugerir que BRUCE no juega un papel claramente importante en la sobrevivencia de las células MSN.

En conclusión, los resultados de este estudio revelan una expresión basal de algunas IAPs en NGC y células MSN. En ambos tipos celulares no se expresan las mismas IAPs ni todas las IAPs analizadas. Nuestros resultados apuntan a que sólo algunas de estas IAPs están involucradas en los mecanismos de sobrevivencia. Finalmente, podríamos sugerir que las IAPs que no están relacionadas con la sobrevivencia, pero que se expresan en NGC y células MSN, podrían participar en otros eventos fisiológicos.

## VIII. SUMARIO

- Las IAPs tienen expresión diferencial dependiendo del tipo celular. Al menos en los tipos celulares estudiados, se expresa más de una IAP.
- Particularmente las NGC, presentan una expresión basal de varias IAPs, las cuales incluyen a la cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina.
- Los estímulos apoptóticos usados (K5 y STS) modifican diferencialmente los niveles proteicos de las distintas IAPs analizadas en las células examinadas. Es decir, el efecto depende del estímulo y del tipo celular.
- El efecto de los estímulos proapoptóticos en los niveles de las IAPs es diferencial para cada IAP. En este sentido, hay IAPs que no se ven afectadas, otras que tienen una regulación a la baja mientras que otras se regulan a la alza.
- La cIAP-1 y la cIAP-2 parecen ser las IAPs que juegan un papel más directo en la sobrevivencia de las NGC bajo condiciones despolarizantes.
- En el caso de las células MSN, la survivina parece jugar un papel predominante en la sobrevivencia celular.

## IX. REFERENCIAS

- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathway of the TNF superfamily: a double edged sword. *Nature Reviews Immunology*. 3: 745-56.
- Alavez, S., Gutiérrez-Kobeh, L., Morán, J. (1996). Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*. 45: 637-646.
- Altman, J. (1972). Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.* 145: 465-514.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. (1997). A novel antiapoptosis gene, *survivin*, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3: 917-921.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., Altieri D.C. (1998). Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol. Chem.* 273:11177-82.
- Balázs, R., Jorgensen, O. S., Hack, N. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*. 27: 437-451.
- Balázs, R., Hack, N., Resink, A., Aronica, E., Van der Valk, J. B. F. (1992). Trophic effect of excitatory amino acids on differentiating granule cells: involvement of calcium and other second messengers. *Molecular Neuropharmacology*. 2: 203-206.
- Balázs, R., Gallo, V., Kingsbury, A. (1998). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Developmental Brain Research*. 40: 269-279.
- Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2004). Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Molecular Cell*. 14: 801-811.
- Birkey Reffey, S., Wurthner, J. U., Parks, W. T., Roberts, A. B., Duckett, C. S. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 26542-26549.
- Bloch, R., Pumplin, D. H. (1988). Molecular events in synaptogenesis: nerve-muscle adhesion and postsynaptic differentiation. *American Journal Physiology*. 254 (3): C345-64.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., *et al.* (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*. 11: 529-541.
- Boatright, K. M., Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 725-731.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Developmental Biology*. 15: 269-90.
- Burgoyne, R., Cambray-Deakin, M. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews*. 13: 77-101.

- Burgoyne, R., Graham, M. E., Cambray-Deakin, M. (1993). Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *Journal of Neurocytology*. 22: 689-695.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 406: 855–862.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 104: 769–780.
- Chen Z., Naito M., Hori S., Mashima T., Yamori T., Tsuruo T. (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:847-854.
- Chu, Z.L., T.A. McKinsey, L. Liu, J.J. Gentry, M.H. Malim, and D.W. Ballard. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- $\kappa$ B control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10057–10062.
- Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H., Wu, Hao. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *Journal of Cell Science*. 115: 679-688.
- Clem, R. J., Sheu, T. T., Richter, B. W., He, W. W., Thornberry, N. A., Duckett, C. S., *et al.* (2001). c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a pro-apoptotic C-terminal fragment. *J Biol Chem*. 276: 7602–8.
- Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M., Morley, S. J. (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 7: 603–15.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 326: 1-16.
- Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H. G., *et al.* (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem*. 279: 5405–12.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1999a). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J*. 18: 5242–51.
- Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gene & Development*. 13 (3): 239-52.
- Deveraux, Q. L., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Reed, J. C., (1999b). Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol*. 19: 388–98.
- D'Mello, S. R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P. (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*. 90: 10989-10993.

- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Altieri, D. C. (2004). An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (33): 34087–34090.
- Donepudi, M., MacSweeney, A., Briand, C., Grutter, M. G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell*. 11: 543–549.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell*. 102: 33–42.
- Duckett, C. S., Li, F., Wang, Y., Tomaselli, K. J., Thompson, C. B., Armstrong, R. C. (1998). Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol. Cell. Biol.* 18, 608–615
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15: 2685–2689.
- Eldadah, B. A., Ren, R. F., Faden, A. I. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of caspase-3 protects cerebellar granule cells from apoptosis induced by serum-potassium deprivation. *The Journal of Neuroscience*. 20 (1): 179-186.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Baláz, R., Jorgensen, O. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *Journal of Neuroscience*. 7 (7): 2203-2213.
- Galvan, V., Kurakin, A. V., Bredesen, D. E. (2004). Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Letters*. 558: 57-62.
- Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. (1995). Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *NeuroReport*. 9 (10): R49-R55.
- Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., Naito, M. (2004). Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature Cell Biology*. 6 (9): 849-60.
- Harvey, A. J., Soliman, H., Kaiser, W., Miller, L. K. (1997). Anti- and proapoptotic activities of baculovirus and *Drosophila* IAPs in an insect cell line. *Cell Death Differ*. 4: 733–44.
- Hauser, H.P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J. Cell Biol.* 141: 1415–1422.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., *et al.* (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein–caspase interaction. *J Biol Chem*. 277: 432–8.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.

- Hersey, P., Zhang, X. D. (2003). Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cellular Physiology*. 196: 9-18.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*. 23: 2134–2145.
- Ho, P., Jabbour, A. M., Ekert, P. G., Hawkins, C. J. (2005). Caspase-2 is resistant to inhibition by inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and can activate caspase-7. *The FEBS Journal*. 272: 1401–1414.
- Hofer-Warbinek, R., Schmid, J. A., Stehlik, C., Binder, B. R., Lipp, J., de Martin, R., et al. (2000). Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J Biol Chem*. 275: 22064–8.
- Hofmann, K., Bcher, P., Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends Biochemical Science*. 22: 155-156.
- Holcik, M., Sonenberg, N., Korneluk, R. G. (2000a). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet*. 16: 469–73.
- Holcik, M., Thompson, C. S., Yaraghi, Z., Lefebvre, C. A., MacKenzie, A. E., Korneluk, R. G. (2000b). The hippocampal neurons of neuronal apoptosis inhibitory protein 1 (NAIP1)-deleted mice display increased vulnerability to kainic acid-induced injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (5): 2286-90.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104: 781–790.
- Komuro, H., Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 260 (5104): 95-7.
- Korhonen, L., Näpänkangas, U., Steen, H., Chen, Y., Martinez, R., Lindholm, Dan. (2004). Differential regulation of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and caspase-3 by NMDA in developing hippocampal neurons; involvement of the mitochondrial pathway in NMDA-mediated neuronal survival. *Experimental Cell Research*. 295: 290– 299.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384: 368-372.
- Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., et al. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with Survivin function. *Nat Cell Biol*. 1: 461–6.
- Li, J., Kim, J.M., Liston, P., Li, M., Miyazaki, T., Mackenzie, A.E., Korneluk, R.G., Tsang, B.K. (1998). Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology* 139: 1321–1328.

- Li, X., Yang, Y., Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediated ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*. 416: 345-347.
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., Korneluk, R. G. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*. 3: 128-33.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J., MacKenzie, A., Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349–353.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408: 1004–1008.
- Lotocki, G., Alonso, O. F., Frydel, B., Dietrich, W. D., Keane, R. W. (2003). Monoubiquitination and cellular distribution of XIAP in neurons after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23 (10): 1129-36.
- Lotz, K., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2004). BRUCE, a Giant E2/E3 Ubiquitin Ligase and Inhibitor of Apoptosis Protein of the *trans*-Golgi Network, Is Required for Normal Placenta Development and Mouse Survival. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (21): 9339–9350.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S., Cohen, G. M. (2002). Proteasome mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*. 277: 36611–6.
- McCarthy, J.V., Ni, J., Dixit, V.M. (1998). RIP2 is a novel NF- $\kappa$ B-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem*. 273: 16968–16975.
- Morán, J., Patel, A. J. (1989). Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Research*. 486: 15-25.
- Morán, J., Dominguez, G., Alavez, S. (1996). NMDA receptor activation and apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos de México*. 44: 49-51.
- Morán, J., Alavez, S., Rivera-Gaxiola, M., Valencia, A., Hurtado, S., (1999). Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 17 (1): 57-65.
- Nachmias, B., Ashhab, Y., Ben-Yehuda, D. (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 231–243.
- Nachmias, B., Ashhab, Y., Bucholtz, V., Drize, O., Kadouri, L., Lotem, M., *et al.* (2003). Caspase-mediated cleavage converts Livin from an anti-apoptotic to a pro-apoptotic factor: implications for drugresistant melanoma. *Cancer Res*. 63: 6340–9.

- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*. 14: 453-501.
- Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L., Wu, H. (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature*. 398: 533-538.
- Perrelet, D., Ferri, A., Liston, P., Muzzing, P., Korneluka, R., Kato, A. (2002). IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons in vivo. *Nature Cell Biology*. 4: 175-79.
- Perrelet, D., Perrin, F. Liston, P., Korneluk, R., MacKenzie, A. Ferrer-Alcon, M., Kato, A. (2004). Motoneuron resistance to apoptotic cell death in vivo correlates with the ratio between X-linked inhibitor of apoptosis proteins (XIAPs) and its inhibitor, XIAP-associated factor 1. *The Journal of Neuroscience*. 24 (15): 3777-85.
- Peter, M. E., Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 10: 26–35.
- Potts, P. R., Singh, S., Knezek, M., Thompson, C. B., Deshmukh, M. (2003). Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 163 (4): 789-799.
- Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98: 14250–14255.
- Richter, B. W., Mir, S., Eiben, L. J., Lewis, J., Reffey, S. B., Frattini, A., Tian, L., Frank, S., Youle, R. J., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., Vezzoni, P., Fearnhead, H. O., Duckett, C. (2001). Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol. Cell. Biol*. 21, 4292–4301.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*. 104: 791–800.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes & Dev*. 13: 3179–3184.
- de la Rosa, E. J., de Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in Neuroscience*. 23: 454-458.
- Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243–1252.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*. 16: 6914–6925.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 96: 10964–10967.

- Salvesen, G. S., Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3 (6): 401-10.
- Samuel, T., Okada, K., Hyer, M., Welsh, K., Zapata, J. M., Reed, J. C. (2005). cIAP1 Localizes to the Nuclear Compartment and Modulates the Cell Cycle. *Cancer Research.* 65 (1): 210-18.
- Sanna, M. G., da Silva Correia, J., Ducrey, O., Lee, J., Nomoto, K., Schrantz, N., *et al.* (2002). IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol.* 22: 1754–66.
- Seidl, R., Bajo, M., Bohm, K., LaCasse, E. MacKenzie, A., Cairns, N., Lubec, G. (1999). Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-like immunoreactivity in brains of adult patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 57: 283-91.
- Sendtner, M., Pei, G., Beck, M., Scheizer, U., Wiese, S. (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res.* 301: 71-84.
- Shankar, S. L., Mani, S., O'Guin, K. N., Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Shafit-Zagardo, B. (2001). Survivin inhibition induces human neuronal tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *Journal of Neurochemistry.* 79: 426-436.
- Shi, Y. (2002a). A conserved tetrapeptide motif: Potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ.* 9: 93–95.
- Shi, Y. (2002b). Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell.* 9: 459–470.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science.* 13: 1979-1987.
- Shin, H., Okada, K., Wilkinson, J. C., Solomon, K. M., Duckett, C. S., Reed, J. C., Salvesen, G. S. (2003). Identification of ubiquitination sites on the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biochemistry Journal.* 373: 965–971.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* 11: 519–527.
- Simons, M., Beinroth, S., Gleichmann, M., Liston, P., Korneluk, R. G., MacKenzie, A. E., Bähr, M., Klockgether, T., Robertson, G. S., Weller, M., Schulz, J. B. (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis proteins delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry.* 72 (1): 292-301.
- Song, Z., Yao, X., Wu, M. (2003). Direct interaction between Survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of Survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 278: 23130–40.
- Srinivasula, S. M., Saleh, A., Hedge, R., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature.* 410 (6824): 112–116.

- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274: 8359–8362.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A. H., Meadows, R. P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S-C., Fesik, S. W. (1999). NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401 (6755): 818–822.
- Sun, C., Cai, M., Meadows, R. P., Xu, N., Gunasekera, A. H., Herrmann, J., Wu, J. C., Fesik, S. W. (2000). NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275 (43): 33777–33781.
- 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. *Mol Cell.* 8: 613–21.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Takahashi, R. (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 8662–7.
- Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T., Takahashi, R. (2004). Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ.* 11: 208–16.
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J.L., Mattmann, C., Tschopp, J. (1998). Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr. Biol.* 8: 885–888.
- 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.
- Thornberry, N., Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science.* 281: 1312-6.
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Hohl, J. B., Angelastro, J. M., Greene, L. A., Shelanski, M. L. (2001). Death in the Balance: Alternative Participation of Caspase-2 and -9 Pathways in Neuronal Death Induced by Nerve Growth Factor Deprivation. *The Journal of Neuroscience.* 21 (14): 5007-16.
- Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K. (2003). NALPs: A novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 95–104.
- Verhagen, A. M., Coulson, E. J., Vaux, D. L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genoma Biol* 2 (7): 3009.1-3009.10.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43–53.

- Vischioni, B., Giaccone, G., Span, S., Kruyt, F. A., Rodriguez, J. A. (2004). Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Experimental Cell Research*. 298: 535-48.
- Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol*. 10: 1359-1366.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281 (5383): 1680-1683.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J-W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008-1012.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., *et al.* (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*. 18: 179-87.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 288: 874-7.
- Yang, Y., Yu, X. (2003). Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *The FASEB Journal*. 17: 790-99.