



11281
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**Vías de activación de caspasas durante la muerte apoptótica de
las células granulares de cerebelo en cultivo inducida por
estaurosporina y bajo potasio**

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

Biól. Andrea Caballero Benítez

Director de Tesis:

Dr. Julio Morán Andrade

Ciudad Universitaria

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

**ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JULIO
MORÁN ANDRADE EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) Y DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA), AL PROYECTO 36235N (CONACyT) Y IN-203400 (PAPIT-UNAM), ASÍ COMO POR EL APOYO OBTENIDO POR PARTE DEL PROGRAMA DE APOYO A LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO (PAEP) (CLAVE DEL PROYECTO 102306), Y POR UNA BECA DE DOCTORADO OTORGADA POR EL CONACyT Y LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSTGRADO (DGEP)

**TESIS CON
FALLA DE CENGEN**

A la memoria de mi padre, por haber sido un verdadero ejemplo de rectitud y lealtad.

A Chuchito, por todo lo que significas para mi.

A mi madre, cariñosamente.

A mis hermanas

A Saul, con respeto y admiración, por ser el niño más agradable del mundo, por hacer las cosas que haces y por la forma que tienes de ver la vida, a pesar de ser tan pequeño.

A mi tío Emilio, muy respetuosamente, por el apoyo que he sentido de tu parte estos últimos años.

A Mani, ¡el mejor de los amigos!, por todas esas cosas que nos unen.

A los amigos

A Manchitas, Neco y Fredo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A Julio, por todos los años compartidos, por tu interés y tus consejos, por haberme permitido iniciarme en esta difícil carrera y hacer las cosas siempre agradables.

A Silver, por todos los momentos, buenos y malos, que hemos compartido, por ser mi verdadero amigo y mi buen ejemplo a seguir. Por ese apoyo incondicional. ¡Gracias por todo!

A Tamara, siempre has estado cerca y siempre has hecho que mi vida tenga momentos muy gratos. ¡Gracias mil por seguir a mi lado!

A Paty, Silvia y Pedro, siempre están presentes y son ya parte de mi vida. En verdad les quiero mucho.

A los amigos que están lejos

A Lupita, por todas esas cosas que hemos compartido, por el apoyo brindado en aquel momento difícil y por todos los buenos momentos.

A todos mis compañeros del laboratorio, por soportarme y tolerarme, por hacer que mi trabajo en este lugar haya sido agradable y disfrutable.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Julio Morán A., Dra. Lourdes Massieu T., Dr. Mauricio Díaz M. Por su valiosa contribución y asesoría a los largo de estos años.

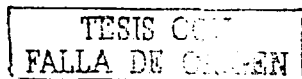
A los miembros del jurado: Dra. Clorinda Arias A., Dra. Limei Zhang Ji, Dra. Lourdes Massieu T., Dr. Ignacio Camacho A., Dr. Agustín Guerrero H., Dr. Felipe Vadillo O., Dr. Julio Morán A. Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus atinados comentarios y sus contribuciones al mismo.

A Guadalupe Domínguez Macouzet, por su asesoría técnica y su importante colaboración durante la realización de este trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
EL CEREBELO	5
ANTECEDENTES GENERALES	10
Papel de la muerte celular programada (MCP) durante el desarrollo	10
Moléculas reguladoras del proceso apoptótico	14
CASPASAS	15
Caspasa-2	23
ANTECEDENTES DIRECTOS	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Obtención de cultivos primarios de CGC	29
Ensayo de sobrevivencia mediante la técnica del MTT	29
Determinación de la condensación de núcleos en CGC (Tinción con Hoechst)	30
Medición de actividad de caspasas	30
Análisis de proteínas (Técnica del Western blot, WB)	31
Técnica para la obtención de fracciones citosólicas y mitocondriales (Fraccionamiento celular)	31
Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
EFFECTO DE LA PRIVACIÓN DE ESTIMULACIÓN DESPOLARIZANTE (K25-K5) Y LA ESTAUROSPORINA (STS) EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC	33
EFFECTO DEL K5 Y LA STS EN LA CONDENSACIÓN DE MATERIAL NUCLEAR DE CGC	34



ACTIVACIÓN DE CASPASAS POR K5 Y STS	35
Actividad de caspasa-3	35
Actividad de caspasa-8	36
Actividad de caspasa-9	37
Actividad de caspasa-1	37
Actividad de caspasa-2	39
Translocación de citocromo c	39
EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS CASPASAS EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC	40
ANEXO	43
EFFECTO DE LA C2-CERAMIDA EN LA MUERTE APOPTÓTICA DE LAS CGC	43
RESULTADOS	44
EFFECTO DE LA C2-CERAMIDA EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC	44
ACTIVACIÓN DE CASPASAS POR C2-CERAMIDA	46
Actividad de caspasa-3	46
Actividad de caspasa-9	47
Translocación de citocromo c	49
Actividad de caspasas-2 y -8	50
EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CASPASAS EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS DE LAS CGC	50
DISCUSIÓN	55
RESUMEN DE RESULTADOS	63
CONCLUSIÓN GENERAL	63
REFERENCIAS	65

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABSTRACT

Apoptotic cell death is a physiological process whose mechanisms of regulation at the molecular and cellular levels are under the control of different molecules such as caspases. These proteases are classified as initiator, like caspases-8 and -9, and executioner or effector, including caspases-3 and -7. The participation of caspase-2 in the executioner phase of apoptosis has been observed in many cell types; however, this caspase is also considered an initiator caspase, depending on the stimuli inducing the apoptotic death. Thus, it seems that different death stimuli induce different caspase pathways. The cerebellar granule cells die apoptotically when they are transferred from high potassium (KCl 25 mM; K25) to low potassium (KCl 5 mM; K5) conditions. This process seems to be mediated by caspase-3 activation. Staurosporine and ceramide also induce apoptosis in this preparation. In order to elucidate the caspase cascade induced by different stimuli in the same cell type we studied the activation of caspases in cerebellar granule cells treated with staurosporine, ceramide and K5. Under these conditions, we found that these stimuli induce the activation of caspase-3, measured as fragmentation and substrate processing. These results were further confirmed by the proteolytic cleavage of PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), an endogenous caspase-3 substrate. We also showed for the first time the activation of caspase-2 in this preparation. Staurosporine activated caspase-2 with a temporal course suggesting that this caspase is induced before caspase-3. Ceramide and K5 activated caspase-2 only marginally. In contrast, caspase-1 was not activated by any treatment. The initiator caspase-9 was also activated by K5, staurosporine and ceramide with a time course shorter than that for caspase-3. This result was in line with the observed release of cytochrome-c to cytosol induced by these stimuli. Caspase-8 did not have an apparent critical role in cell death induced by any of these treatments. The effect of caspase inhibitors on the viability and morphology of these cells treated with staurosporine, ceramide and K5 supported these results. Cerebellar granule cells treated with inhibitors of caspase-9 protected from death when cultures were treated with K5 or ceramide. Also, in staurosporine-treated

cultures, the incubation with caspase inhibitors partially protected CGC, being caspase-2 and -9 inhibitors the most efficient. The results obtained in this study suggest that staurosporine induces the activation of a different pathway of caspases than K5 and ceramide during the apoptotic cell death of granule neurons. Although K5 and ceramide induces the activation of a similar caspase cascade, they show a different temporal course of caspases activation. Thus, different stimuli may induce different caspase cascade in the same cell.

RESUMEN

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico cuyos mecanismos de regulación están bajo el control de diferentes moléculas como las caspasas, que se clasifican en iniciadoras como las caspasas-8 y -9, y como efectoras, que incluye a las caspasas-3 y -7. En muchos modelos de muerte apoptótica en donde se ha detectado la participación de la caspasa-2, se ha determinado su papel como caspasa efectora, sin embargo, se le ha considerado también como iniciadora, dadas sus características estructurales. El papel de la caspasa-2 en la cascada de activación de caspasas, depende del estímulo de muerte y del tipo celular; así, diferentes estímulos de muerte pueden inducir diferentes vías de activación de caspasas. Las células granulares de cerebelo mueren apoptóticamente cuando son privadas de estimulación despolarizante (K25-K5). La estaurosporina y la ceramida también inducen la muerte apoptótica de estas células. Para determinar la secuencia de activación de caspasas inducida por diferentes estímulos en el mismo tipo celular se estudió la participación de las caspasas en las células granulares de cerebelo tratadas con 5 mM de KCl (K5), estaurosporina y ceramida. Los resultados obtenidos mostraron que ambos estímulos inducen la activación de la caspasa-3, los cuales se confirmaron al determinar el rompimiento proteolítico de PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa), un sustrato endógeno de la caspasa-3. En este estudio demostramos por primera vez la participación de caspasa-2 en esta preparación. La estaurosporina indujo preferentemente la activación y fragmentación de la caspasa-2, cuyo curso

temporal sugiere que su activación se induce antes de la activación de la caspasa-3. La ceramida induce también la activación de la caspasa-2, sin embargo, tiene una participación marginal en este modelo. El K5 parece no inducir la activación de caspasa-2. Por otro lado se observó que ninguno de los tres estímulos indujo la activación de la caspasa-1. Así mismo, el K5, la estaurosporina y la ceramida indujeron la activación y fragmentación de la caspasa-9, que generalmente participa en la fase de iniciación del proceso de muerte, así como la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol. Bajo estas condiciones, se observó una ligera activación de la caspasa-8, sin embargo, parece no participar de manera importante en la muerte apoptótica de las células granulares de cerebelo inducida por los tres estímulos utilizados en este estudio. El efecto de los péptidos inhibidores de caspasas en la morfología y sobrevivencia de estas neuronas, así como en la activación de la caspasa-3, confirman estos resultados. El inhibidor de la caspasa-9 disminuye la muerte de estas neuronas cuando se induce por efecto de la estaurosporina; en el caso del K5 y la ceramida, además de inhibir este proceso apoptótico, inhibe la activación de la caspasa-3, en tanto que el inhibidor de la caspasa-2, la inhibe en el caso de las células tratadas con estaurosporina. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la estaurosporina induce una vía de activación de caspasas diferente a la inducida por K5 y ceramida en estas células. Estas dos últimas condiciones inducen la activación de la misma cascada de caspasas; sin embargo, éstas muestran diferentes cursos temporales de activación. Así, diferentes estímulos inductores de muerte apoptótica pueden inducir distintas vías de caspasas en las mismas células.

INTRODUCCIÓN

El Sistema Nervioso (SN) constituye una de las estructuras más complejas del organismo, con un alto grado de organización funcional y estructural. Esto se debe en gran parte al resultado de una serie de eventos regulados finamente que se llevan a cabo de una manera coordinada en el tiempo y en el espacio durante el desarrollo embrionario. Así mismo, el SN lleva a cabo una serie de funciones muy complejas y diversas que dependen de las interconexiones precisas formadas por los diferentes tipos celulares neuronales que lo conforman. El establecimiento de patrones de madurez de estas conexiones neurales es un proceso resultante de 5 eventos propuestos que ocurren durante distintas etapas del desarrollo:

- 1) Proliferación. Una población de células precursoras, inducida del ectodermo indiferenciado, comienza a proliferar dando lugar a una enorme cantidad de células neuronales aún indiferenciadas.
- 2) Migración. Las células comienzan a diversificarse dando lugar a las células gliales y a células neuronales inmaduras, las cuales comienzan a migrar a partir de las zonas germinales.
- 3) Diferenciación. Desde que comienza el fenómeno de migración, las células reciben señales tróficas que son clave para el establecimiento de las características fisiológicas.
- 4) Formación y establecimiento de procesos. Las neuronas comienzan a extender sus axones proyectándose a las vecindades de sus blancos eventuales, dando lugar a los circuitos neuronales.
- 5) Muerte celular. Este evento ocurre como un mecanismo de muerte celular programada (MCP). Existe una gran cantidad de señales que juegan un papel muy importante a lo largo del desarrollo, como los factores tróficos. Durante este proceso muchas células neuronales ya diferenciadas mueren, modificándose algunas de las conexiones sinápticas formadas inicialmente.

Esta serie de eventos se lleva a cabo en todas las regiones del sistema nervioso central (SNC). Uno de los aspectos más importantes del desarrollo del SN es la participación de señales externas, las cuales determinarán el destino

último de las células, ya sea hacia un proceso de muerte y remoción de las mismas o a la sobrevivencia y formación de los circuitos neuronales, definiendo así las poblaciones celulares que conformarán al SNC (Purves y Lichtamn, 1995). Los fenotipos neuronales particulares se generan por la expresión selectiva de genes; es aquí donde los factores internos y externos juegan un papel muy importante controlando esta expresión, la cual puede modificarse a nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional o postraduccional. Los factores tróficos juegan un papel muy importante en procesos de diferenciación. Es posible que la ausencia de los mismos promueva la activación de procesos metabólicos que repriman o activen la expresión de genes específicos, generando una serie de procesos cuyo fin último es la muerte de la célula.

EL CEREBELO

El cerebelo ha sido tomado como un modelo importante para el estudio de los diferentes procesos que tiene lugar durante el desarrollo, dadas sus características estructurales, su localización en el SNC, su arquitectura laminar y los tipos celulares que la conforman. Esta estructura contiene una diversidad de neuronas interconectadas con otras áreas del cerebro a través de circuitos neuronales complejos. El cerebelo recibe información sobre la planeación del movimiento que proviene de estructuras cerebrales concernientes a la programación y ejecución del movimiento, a través de las neuronas de las cortezas motora y premotora que proyectan sus axones a diferentes regiones del cerebro. El cerebelo se origina de la tercera vesícula cerebral, el rombencéfalo, que resulta a su vez del engrosamiento que sufre el tubo neural una vez que se ha cerrado el neuroporo anterior.

El cerebelo se divide en 3 lóbulos: el anterior, el posterior y el floculonodular (Figura 1).

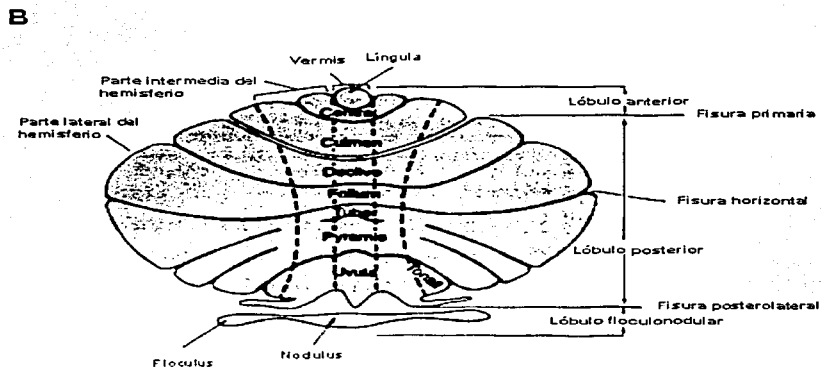
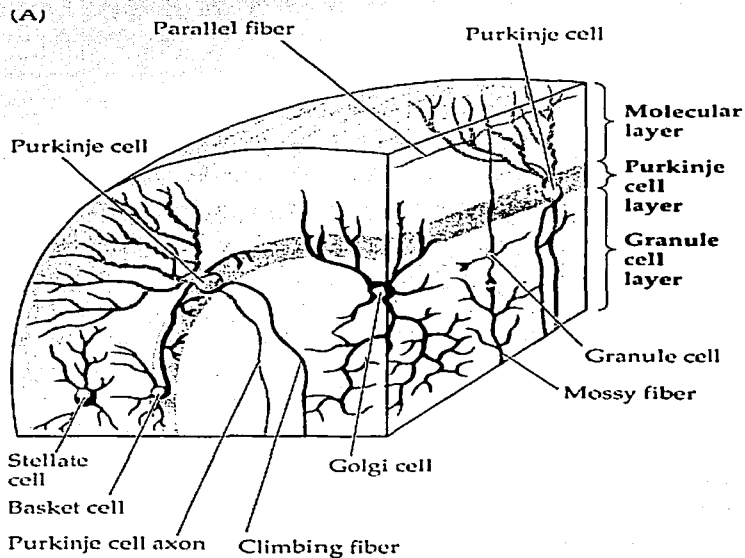


Figura 1. Organización anatómica del cerebelo. El cerebelo tiene tres regiones funcionales: el vermis central y las zonas lateral e intermedia en cada hemisferio. **A)** Sección sagital media. Se muestra la posición del cerebelo en relación al tallo cerebral y las estructuras foliadas del cerebelo. **B)** La fisura primaria divide al cuerpo del cerebelo en dos lóbulos, anterior y posterior. La fisura posterolateral separa el lóbulo floculonodular (Tomado de DeLong, 2000).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

La corteza cerebelar es una estructura formada por 3 capas que contienen 5 tipos neuronales: las células estrelladas, las células en canasta, las células de Golgi, las células de Purkinje y las células granulares (Figura 2). La capa externa o capa molecular se compone principalmente de axones de células granulares, los cuales se conocen como fibras paralelas pues corren de manera paralela al eje longitudinal del folium (este último se encuentra debajo de la corteza cerebelosa). También contiene células estrelladas y células en canasta que funcionan como interneuronas, así como las dendritas de las células de Purkinje.



© 2001 Sigma Associates, Inc.

Figura 2. Arreglo citoarquitectónico de la corteza cerebelar. Sección vertical de una folia de la corteza cerebelar que muestra la distribución de los tipos celulares que conforman las tres capas de la corteza cerebelar. Molecular layer (capa molecular); Purkinje cell layer (capa de células de Purkinje); granule cell layer (capa de células granulares); parallel fiber (fibra paralela); Purkinje cell (célula de Purkinje); granule cell (célula granular); mossy fiber (fibra musgosa); stellate cell (célula estrellada); basket cell (célula en canasta); Golgi cell (célula de Golgi); Purkinje cell axon (axón de célula de Purkinje); climbing fiber (fibra trepadora).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Debajo de la capa molecular se encuentra la capa de células de Purkinje, que contiene los cuerpos celulares de estas neuronas (50 a 80 μm de diámetro). Estas células se reorganizan de lado a lado en una sola capa, tienen árboles dendríticos que se extienden dentro de la capa molecular. Las células de Purkinje envían sus axones fundamentalmente a la materia blanca. Estas neuronas utilizan principalmente al ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y constituyen la única vía de salida de esta estructura.

La siguiente es la capa granular, que contiene un gran número de paquetes densos de neuronas pequeñas, las células granulares. Hay también células de Golgi que se encuentran en el borde externo. La capa granular contiene pequeños espacios llamados glomérulos cerebelares, donde las células forman contactos sinápticos complejos con las fibras aferentes de las células musgosas.

Las fibras musgosas se originan de uno de los núcleos pontinos y de neuronas de la médula espinal. Estas fibras tienen influencia sobre las células de Purkinje a través de las sinapsis que establecen con las células granulares. Estas células son neuronas excitadoras del glomérulo cerebelar. Sus axones suben a través de la capa molecular haciendo conexiones excitadoras a lo largo de su camino con las células de Purkinje. Las fibras paralelas intersectan con dendritas de algunas células de Purkinje, las cuales se orientan perpendicularmente a las fibras paralelas.

Las trepadoras son otras fibras excitadoras que se originan de un sólo lugar de la médula oblongada, el núcleo olivar inferior. Son llamadas fibras trepadoras por la morfología de sus terminaciones sinápticas en las células de Purkinje. Todas sus sinapsis son excitadoras.

La formación de las sinapsis constituye uno de los procesos regulados finamente durante el desarrollo. Previo a ello, se lleva a cabo el retraimiento de muchos procesos que no alcanzaron el destino correcto o que no se desarrollaron totalmente. Todos estos eventos están directamente relacionados con una serie de estímulos macro y microambientales, siendo éstos a la vez producto de la información genética y de estímulos externos. Se sabe que las células granulares presentan pequeños árboles dendríticos y las primeras innervaciones que reciben

durante el desarrollo vienen de una población de fibras musgosas excitadoras que provienen del puente y de la médula espinal (Altman, 1972). Esto ocurre en el quinto día posnatal. Las fibras musgosas hacen contacto con las dendritas de las células granulares en los glomérulos cerebelosos. Se ha sugerido que las fibras musgosas ejercen un efecto neurotrófico en dichas células. Las células granulares tienen su principal grupo de células blanco en las células de Purkinje y parece que las sinapsis con dichas células juegan un papel muy importante en la sobrevivencia de las células granulares (Sotelo y Changeux, 1974). Estas sinapsis se establecen alrededor del día 12 posnatal.

Durante la diferenciación, todos los tipos celulares que conforman al cerebelo van adquiriendo su fenotipo neural definitivo que les conducirá a un estado especializado, ampliando así la expresión de ciertas características, tanto estructurales como metabólicas. Durante este proceso, las células definen el neurotransmisor a utilizar durante el estado maduro, lo cual conlleva a la expresión de la maquinaria bioquímica para la síntesis, liberación y captura del neurotransmisor.

Durante el período de neurogénesis un gran porcentaje de neuronas muere. Este fenómeno se ha interpretado como una estrategia evolutiva para establecer el número correcto de neuronas y las conexiones apropiadas que finalmente formarán parte del SNC de un organismo completamente desarrollado (Oppenheim, 1991). Particularmente, se ha observado que durante el desarrollo del cerebelo del ratón, hay una pérdida considerable (20-30%) de neuronas granulares en etapas posnatales, asociada al establecimiento de la red neuronal de la corteza cerebelar (Wood et al, 1993).

La influencia del medio externo juega un papel muy importante en los procesos del desarrollo y es un fenómeno que junto con la expresión secuencial de genes y represión de algunos otros determina en gran parte la sobrevivencia de las células y determinan también cuántas han de morir en forma programada.

La ausencia de factores tróficos puede ocasionar la activación de un proceso metabólico que puede inducir la represión de genes maestros cuya

expresión es requerida por las células para mantener su actividad metabólica y sobrevivir.

Se ha considerado al ácido glutámico como una de las moléculas más importantes durante el desarrollo de las células granulares de cerebelo (CGC). Balasz y col. (1988) sugieren que el NMDA previene la muerte de CGC que normalmente se observa en cultivos. Ellos han estudiado el efecto de la despolarización por potasio (KCl) en la sobrevivencia de estas células y proponen que esta despolarización mimetiza la acción que ejercen las fibras musgosas en un estado temprano del desarrollo de las CGC *in vivo* (Gallo et al, 1987). También concluyen que el efecto trófico de la despolarización por KCl está mediado por un incremento en las concentraciones de Ca^{++} intracelular, que entra a través de los canales de Ca^{++} sensibles a voltaje. Así, es posible que el NMDA esté reemplazando al KCl ya que su receptor posee un canal permeable a Ca^{++} . Se sabe también que las CGC requieren de dicha condición *in vitro* sólo durante un tiempo corto, tiempo que coincide con la actividad de las fibras musgosas sobre dichas células *in vivo* (Balász et al, 1988).

ANTECEDENTES GENERALES

Papel de la muerte celular programada (MCP) durante el desarrollo.

La MCP ocurre gradualmente a través de un mecanismo apoptótico, un evento biológico en el que intervienen una gran cantidad de moléculas que regulan este proceso a diferentes niveles. Este tipo de muerte se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que la diferencian de la muerte necrótica (Tablas I y II). La muerte necrótica generalmente se presenta en condiciones patológicas y en respuesta a daños severos, tanto a nivel celular como tisular. Este tipo de muerte se caracteriza por una entrada masiva de calcio, incremento en el volumen de organelos intracelulares y un hinchamiento general que lleva

	APOPTOSIS	NECROSIS
Patrón de muerte	- Células individuales	- Grupos de células
Tamaño celular	- Encogimiento celular - Fragmentación celular	- Hinchamiento celular
Membrana Plasmática	- Se preserva la continuidad de la misma - Burbujeo - Translocación de la fosfatidilserina	- Sin alteraciones importantes - Lisis temprana
Mitocondria	- Aumento en la permeabilidad de la membrana - Liberación del contenido mitocondrial hacia el citoplasma; citocromo c, Apaf-1, AIF - Preservación relativa de la estructura mitocondrial	- Hinchamiento mitocondrial - Estructura desordenada
Organelos	- Encogimiento - Internalización en cuerpos apoptóticos	- Hinchamiento - Lisis
Núcleo	- Cromatina: condensación y fragmentación	- Lisis de la membrana nuclear
Degradación del ADN	- ADN: fragmentación internucleosomal en fragmentos de 180 pb, extremos 3' libres, liberación de ADN al citoplasma	- Fragmentación al azar y degradación difusa
Degradación celular	- Fagocitosis - No hay respuesta inflamatoria	- Invasión de macrófagos - Generación de respuesta inflamatoria

Tabla I. Principales características morfológicas de la muerte apoptótica y necrótica. Se muestran las diferencias más importantes entre los dos tipos de muerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	APOPTOSIS	NECROSIS
Estímulos generales	<ul style="list-style-type: none"> - Señales endógenas - Señales intercelulares - Procesos degenerativos - Embriogénesis 	<ul style="list-style-type: none"> - Procesos degenerativos
Estímulos específicos	<ul style="list-style-type: none"> - Privación de factores tróficos (NGF y neurotrofinas en general) - Activadores de muerte (receptores que inducen muerte apoptótica) - Toxicidad (hormonas, radiación, radicales libres) 	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidad - Procesos isquémicos severos - Radiación
Procesos moleculares	<ul style="list-style-type: none"> - Vías programadas de reacciones (activación de: caspasas, endonucleasas internucleosomales, transglutaminasas) - Síntesis de ARN <i>de novo</i> - Síntesis de proteínas <i>de novo</i> - ATP 	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere de síntesis de ARN <i>de novo</i> - No requiere de síntesis de proteínas <i>de novo</i> - No requiere de energía - Disminución de ATP

Tabla II. Mecanismos moleculares que regulan la muerte apoptótica y sus diferencias con la muerte necrótica. La muerte apoptótica es un mecanismo finamente regulado en el que participan una gran cantidad de moléculas que inducen la activación de complejos procesos bioquímicos, no así la muerte necrótica, caracterizada por ser un evento pasivo que genera reacciones inflamatorias.

finalmente a la lisis de la célula, la cual libera su contenido al espacio extracelular dañando a las células adyacentes, generando un proceso inflamatorio (Figura 3).

La apoptosis es un proceso muy conservado evolutivamente que se presenta en condiciones fisiológicas y patológicas. El desarrollo normal de los organismos depende de la eliminación de ciertas células, proceso que se lleva a cabo mediante la activación de un programa de muerte apoptótica. La eliminación de órganos vestigiales y el ajuste del tamaño de poblaciones celulares después de un período inicial de producción excesiva, como en el caso del SN, son algunos de los procesos en los que la muerte apoptótica juega un papel preponderante.

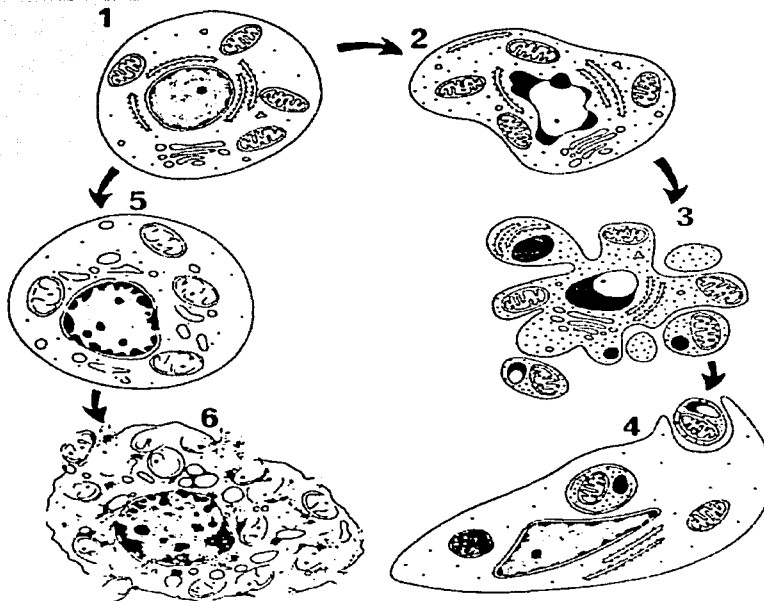


Figura 3. Cambios morfológicos asociados a la apoptosis (derecha) y necrosis (izquierda). 1) célula normal; 2) condensación y regionalización de la cromatina, alteraciones en la envoltura nuclear; 3) formación de protuberancias en la membrana celular, las cuales se separan posteriormente para producir los cuerpos apoptóticos que contienen organelos y material nuclear fragmentado; 4) los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células adyacentes; 5) señales de necrosis temprana en una células dañada de manera irreversible, aglutinación de la cromatina en unidades discretas, hinchamiento de organelos y aparición de densidades floculares en la matriz de la mitocondria; 6) las membranas se rompen y las células se desintegran (Tomado de Kerr y Harmon, 1991).

Algunos de los cambios morfológicos asociados a este tipo de muerte son la condensación de la cromatina nuclear, la condensación del citoplasma que

provoca el encogimiento de las células, la fragmentación internucleosomal del ADN y la formación de pequeños fragmentos de membrana plasmática que contienen en su interior material nuclear y organelos llamados cuerpos apoptóticos. Los cambios bioquímicos que caracterizan este tipo de muerte son la activación de transglutaminasas específicas, la translocación de la fosfatidil-serina que representa una señal para la fagocitosis por parte de los macrófagos principalmente, que no genera un daño sobre las células adyacentes, activación de vías y moléculas específicas tales como las proteasas de cisteína de la familia de ICE/Ced-3, y la fragmentación por endonucleasas específicas del ADN nuclear en las regiones internucleosomales para formar fragmentos de aproximadamente 185 pares de bases (pb).

Moléculas reguladoras del proceso apoptótico

La muerte apoptótica es un proceso activo determinado por un programa genético. Este programa puede ser activado en respuesta a ciertas señales externas como la privación de un factor de crecimiento u hormona, la exposición a determinadas concentraciones de compuestos tóxicos o radiaciones, así como la activación de receptores relacionados con la promoción de la muerte (Fas/Apo1 y el receptor TNF, factor de necrosis tumoral). La misma señal puede inducir la sobrevivencia o la muerte dependiendo del estado de maduración celular y/o de las características de la señal (concentración, duración, etc). La regulación precisa del proceso apoptótico es esencial para el desarrollo óptimo de los organismos. Se sabe que alguna falla en esta regulación puede inducir el desarrollo de varias enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas.

En los últimos años se han identificado y caracterizado una gran cantidad de moléculas que participan activamente durante la muerte apoptótica regulando este proceso a diferentes niveles. La caracterización genética y funcional de los genes *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* ha permitido entender el proceso de muerte que se da durante el desarrollo de este organismo. Los productos proteicos de *ced-3* y *ced-4* inducen muerte celular, en tanto que el

producto proteico de ced-9 la inhibe (Hengartner, 1996). Los homólogos en mamíferos de estas proteínas ya se han identificado. El homólogo de ced-4 es Apaf-1 (Apoptotic adaptor factor-1) (Zou, et al, 1997), una proteína adaptadora importante que interactúa con algunas proteasas; los miembros de la familia del Bcl-2, son los homólogos de ced-9 (Reed, 1994). Los homólogos de ced-3 son los miembros de una familia de proteasas de cisteína denominadas caspasas que constituyen uno de los puntos centrales de este trabajo.

CASPASAS

El homólogo de ced-3 es ICE perteneciente a una familia de proteasas de cisteína, denominadas caspasas, enzimas altamente específicas y con un requerimiento de residuos específicos de ácido aspártico para el procesamiento proteolítico de sustratos (Thornberry et al, 1992). Hasta el momento se han descrito 14 miembros, los cuales, a excepción de la caspasa-9, comparten una secuencia homóloga que contiene el pentapéptido QACRG en el cual el residuo de cisteína constituye el sitio catalítico de la proteína. En el caso de la caspasa-9 el pentapéptido está constituido por la secuencia QACGG (Duan 1996). Estas caspasas son moléculas importantes en las vías de señalización de la muerte apoptótica.

Estas proteasas normalmente se sintetizan como zimógenos (proenzimas) de 30 a 50 kDa aproximadamente y con actividad catalítica muy baja. Están constituidas por un prodominio y 2 subunidades catalíticas de ~20 kDa (p20) y ~10 kDa (p10). El procesamiento proteolítico en residuos específicos de Asp, induce la activación de estas proteasas, generando así enzimas homodiméricas activas (Thornberry et al, 1992; Walker 1994; Rotonda et al, 1996). El procesamiento catalítico puede estar mediado por otras proteasas o puede ser autocatalítico, inducido por la unión de moléculas que funcionan como cofactores o bien, por la remoción de inhibidores (Figura 4). El dominio N-terminal de la proenzima que es altamente variable en longitud y secuencia, está involucrado en la regulación de la

activación de la proenzima. Las caspasas que se han identificado hasta el momento son:

caspara-1 (ICE)

caspara-5 (ICERel-II, TY)

caspara-12

caspara-8 (FLICE, MACH, Mch5), iniciadora.

caspara-9 (ICE/LAP6, Mch6), iniciadora.

caspara-10 (FLICE2, Mch4), iniciadora.

caspara-3 (Yama, CPP32, apopaina), efectora.

caspara-6 (Mch2), efectora.

caspara-7 (ICE/LAP3, Mch3, CMH-1), efectora.

caspara-2 (Ich.1), iniciadora/activadora.

caspara-4 (ICERel-III, TX, ICH-2)

caspara-11 (Ich-3)

caspara-14 (MICE)

Existe una clasificación de caspasas que se basa en el tamaño del prodominio. Las caspasas con grandes prodominios como la -2, la -8 ó la -9, funcionan como iniciadoras de señales que se encuentran al inicio de la cascada de activación, mientras que las que presentan un prodominio pequeño como la -3, la -6 o la -7, funcionan como efectoras de las señales iniciales, continuando así con la cascada proteolítica de activación (Figura 5). La caspara 14, es la única que tiene un prodominio pequeño, pero por sus características funcionales, se le ha clasificado dentro de la subfamilia de la caspara-1, cuyos miembros tienen un prodominio grande (Hu et al, 1998).

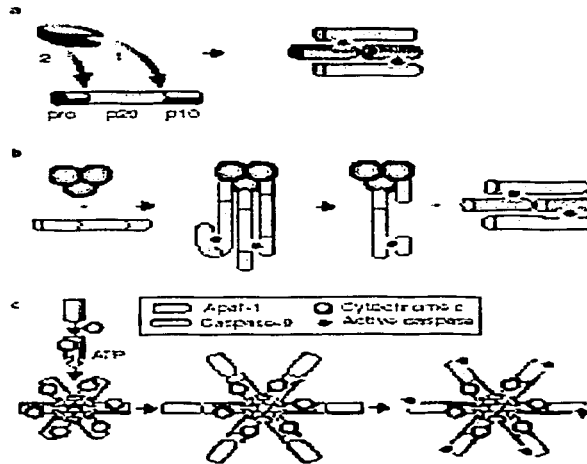


Figura 4. Mecanismos de activación de caspasas. Rompimiento proteolítico de una caspasa efectora por: a) una caspasa apical; b) reclutamiento de varias moléculas de procaspasa apicales como la procaspasa-8; estas moléculas se mantienen próximas unas a otras induciendo así una activación cruzada y el rompimiento de caspasas efectoras; c) formación de holoenzima por el citocromo-c liberado de la mitocondria y ATP, necesario para la oligomerización de la molécula adaptadora Apaf-1 que permite el reclutamiento de procaspasa-9 al complejo de activación llamado "apoptosoma". Al parecer, la activación de la caspasa-9 está mediada por un cambio conformacional y no por un proceso proteolítico (Tomado de Hengartner et al., 2000).

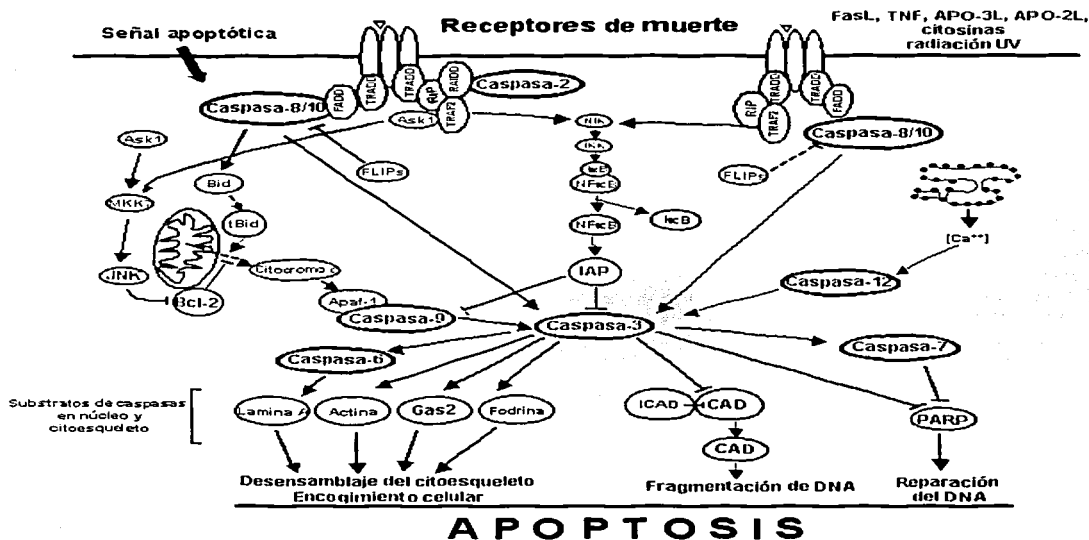


Figura 5. Cascada proteolítica de activación de caspasas y su posible regulación. El modelo sugiere que una señal proapoptótica induce la activación de vías de señalización en las que participan diferentes moléculas como las caspasas, proteínas adaptadoras y proteínas como el citocromo c liberado al citosol. Algunas proteínas inhibidoras pueden sufrir modificaciones estructurales que las llevan a inactivarse. Todos estos procesos regulan la activación de caspasas. RAIDD (Recruitment apoptotic inductor death domain), FADD (Fas-associated protein with death domain), FLIPs (FADD-like ICE inhibitory proteins), ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), TRADD (TNF-receptor associated death domain), RIP (receptor interacting protein), TRAF2 (TNFR-associated factor-2), MKK7 (MAP/Erk kinase kinase-1), tBid (truncated Bid) (Modificado de Thornberry 1998).

Las alteraciones morfológicas que acompañan a la muerte apoptótica como son la fragmentación internucleosomal del ADN, la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la ondulación de la membrana plasmática y la formación de los cuerpos apoptóticos, requieren en general de la activación de las caspasas. Se ha sugerido que las caspasas que funcionan como efectoras son responsables de los cambios celulares que se dan durante la apoptosis, tal es el caso de las caspasas -2, -3, -6 y -7. Muchos de los sustratos proteicos del citoesqueleto y

núcleo que son procesados proteolíticamente por estas caspasas ya se han identificado (Tabla III). En muchos tipos celulares y ante diferentes estímulos, los altos niveles de actividad de rompimiento de varios sustratos tales como DEVD (Glu-Ala-Asp-Glu, sustrato preferencial de caspasa-3) están comúnmente asociados a la activación de las caspasas y a la apoptosis.

Otros estudios indican que las caspasas rompen a la proteína antiapoptótica Bcl-2, generando así un producto proapoptótico (Cheng et al, 1997). Se sabe también que Bcl-x_L sufre un procesamiento similar, ambas moléculas son antiapoptóticas y una vez que han sido procesadas por las caspasas durante la apoptosis, se convierten en proteínas letales (Cheng et al, 1997; Clem et al, 1998). Muchas proteínas de citoesqueleto tales como la actina y la gelsolina, son sustratos potenciales de varias caspasas (Mashima et al, 1995; Kamada et al, 1998). Se ha demostrado el rompimiento de esta proteína en la apoptosis *in vivo*, así como su rompimiento por caspasa-3 *in vitro* (Kothakota et al, 1997). La lamina A, una proteína constitutiva de los filamentos internos del núcleo celular es un sustrato potencial de la caspasa-6, la cual puede ser procesada y activada por múltiples estímulos. Estudios recientes indican que esta caspasa una vez activada funciona como una laminasa que rompe a la lamina A, convirtiéndola también en un fragmento apoptótico (Orth et al, 1996).

La α -espectrina no eritroide, también llamada α -fodrina, se rompe por caspasas durante la muerte neuronal apoptótica de células granulares de cerebelo. Sin embargo, puede ser también proteolisada por la calpaína, una proteasa de cisteína activada por Ca²⁺ que se sobreexpresa ante varias condiciones patológicas que normalmente están asociadas a la muerte necrótica (Azuma et al, 1991; Wang et al, 1994); sin embargo, algunos estudios indican que esta proteasa también se activa durante la apoptosis en varios tipos celulares y ante diferentes estímulos (Squier et al, 1994). Otras proteínas involucradas en mantener la citoarquitectura celular tales como PAK2, FAK y rabaptina-5, son sustratos importantes de las caspasas (Kothakota et al, 1997; Rudel y Bokoch, 1997; Cosulich et al, 1997).

Uno de los sustratos mejor identificados de una de las caspasas efectoras más estudiadas hasta el momento, la caspasa-3, es la proteína nuclear (poli (ADP) ribosa polimerasa (PARP), una enzima involucrada en la reparación del ADN (Nicholson et al, 1995). Existen muchos estímulos que pueden inducir la activación de la caspasa-3 tales como la privación de suero, la activación del receptor Fas, la activación de granzime B (una proteasa de serina), y la radiación ionizante (Chinnaiyan et al, 1996; Jacobson et al, 1996). Otros estudios indican que la caspasa-3 interactúa con otras proteínas citoplásmicas para generar la fragmentación del ADN nuclear (Liu et al, 1996, Yang et al, 1997) como el factor de fragmentación del DNA (DFF). Esta es una molécula citosólica mediadora de este proceso y está constituida por 2 subunidades de 40 y 45 kDa, esta última puede ser procesada proteolíticamente por la caspasa-3 generando pequeños polipéptidos. Una vez que la subunidad de 45 kDa se ha procesado y activado, se requiere para el rompimiento de sustratos nucleares tales como PARP y lamina B, sin embargo, no se requiere para la fragmentación del ADN nuclear, la cual puede estar mediada principalmente por nucleasas dependientes de Ca^{2+}/Mg^{2+} (Nikonova et al, 1993; Peitsch et al, 1993). Otros sustratos nucleares conocidos de la caspasa-3 son las proteínas U1, RNP e ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) (Enari et al, 1998; Sakahira et al, 1998).

Estudios recientes indican que PARP puede ser también sustrato de muchas otras caspasas *in vitro*, sin embargo, *in vivo* las caspasas-3 y-7 parecen ser las responsables de esta fragmentación. Se tienen evidencias de que el proteosoma se relocaliza del núcleo a los cuerpos apoptóticos durante la muerte celular programada (Pitzer et al, 1996), estos últimos constituyen una de las últimas fases de este importante proceso fisiológico.

La activación de las caspasas iniciadoras requiere de la participación de moléculas específicas consideradas como cofactores, un mecanismo comúnmente observado en las proteasas en general. La unión de estos cofactores se dispara por una señal proapoptótica; esta unión está mediada por al menos dos regiones consenso motivo distintas que residen en el prodominio de las caspasas y en la molécula que funciona como cofactor (Thornberry et al, 1998), por ejemplo, la

activación de la caspasa-8, requiere de su asociación con su cofactor FADD (Fas-associated Protein with death domain), a través de DED (death effector domain) (Boldin et al, 1996), en tanto que la activación de la caspasa-9 involucra la formación de un complejo con el cofactor Apaf-1 a través de CARD (caspase recruitment domain) (Li et al, 1997). La caspasa-9 parece requerir de múltiples factores como el citocromo c. La caspasa-2 también se activa mediante el cofactor CARD (Chou et al, 1998).

Se ha propuesto que las caspasas están latentes en las células en forma de monómeros a una concentración muy baja y en complejos que impiden su autocatálisis y que los cofactores permiten que dos o más caspasas precursoras estén próximas unas a otras, permitiendo así su activación autocatalítica, induciendo un cambio conformacional en éstas, ya sea directamente o removiendo alguna molécula inhibidora. Sin embargo, se sabe poco sobre la regulación de la interacción entre caspasas y sus cofactores.

En el caso de la activación de las caspasas efectoras, existen evidencias que apoyan el modelo de la cascada proteolítica mediada por la activación de estas proteasas (Figura 5). Una señal proteolítica lleva a la activación de una caspasa iniciadora que, a su vez, procesa y activa a las caspasas efectoras, de ahí que diferentes señales apoptóticas induzcan los mismos cambios bioquímicos y morfológicos (Ashkenazi et al, 1998).

En el SNC la clasificación de estas caspasas es limitada. Las caspasas-3, -7, -2 -9 y -8 son de las más abundantes. Estas proteasas intervienen en la muerte apoptótica que se presenta durante el desarrollo embrionario y durante algunas enfermedades neurodegenerativas.

En el caso de la caspasa-9, su activación durante la muerte neuronal es esencial. La caspasa-9 forma parte de un complejo molecular importante, denominado apoptosoma, que incluye a Apaf-1 y al citocromo c. Recientemente se ha propuesto que el gen de la caspasa-9 produce también dos isoformas, una proapoptótica y otra antiapoptótica (Seol y Billiar 1999).

Caspasa	Nombre anterior	Peso molecular y subunidades	Sustratos endógenos específicos	Secuencias de reconocimiento
Caspasa-1	ICE	- Proenzima: 45,148 kDa - Subunidades catalíticas: p20 y p10	- Pro-IL-1 β - U1-70 kDa? - PARP - Procaspasa-1, -3, -4	YVHD-A GGPD-G DEVD-G
Caspasa-2	Nedd, ICH-1	- Proenzima: 49,855 kDa - Subunidades catalíticas: p12/14 y p19	- PARP? - Procaspasa-3	DEVD-G
Caspasa-3	CPP32, YAMA apopain	- Proenzima: 31,594 kDa - Subunidades catalíticas: p17 y p12	- PARP - U1-70 kDa - DNA-PK (cs) - Proteína cinasa C delta - Huntingtina - SREBP-1 y SREBP-2 - Ribonucleoproteínas - Factor de fragmentación del DNA (DFF)	DEVD-G GGPD-G DEVD-N DMOX-N DXKQ DEPD-S DEAD-G DETD-S/DAVD-T
Caspasa-4	ICE(rel III, TX ICH-2)	- Proenzima: 43,262 kDa - Subunidades catalíticas: no definidas	Similar a caspasa-1	
Caspasa-5	ICE(rel III, TY)	- Proenzima: 33,409 kDa - Subunidades catalíticas: p20 y p10		
Caspasa-6	Mch2	- Proenzima: 47,814 kDa - Subunidad catalítica: p18 y p11	- Lamina A - PARP? - U1-70 kDa?	VEID-N DEVD-G GGPD-G

Caspasa	Nombre anterior	Peso molecular y subunidades	Sustratos endógenos específicos	Secuencias de reconocimiento
Caspasa-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	- Proenzima: 34,276 kDa - Subunidades catalíticas: p20 y p11	- PARP - Sustratos similares a caspasa-3 (no definido)	DEVD-G
Caspasa-8	MACH, FLICE Mch5	- Proenzima: 55,391 kDa - Subunidades catalíticas: p18 y p10	- Procaspasas en general	DEVD-G
Caspasa-9	ICE-LAP6, Mch6	- Proenzima: 45,322 kDa - Subunidades catalíticas: p35 y p10	- PARP? - Procaspasa-3	DEVD-G
Caspasa-10	Mch4	- Proenzima: 59,879 kDa - Subunidades catalíticas: p23/17 y p12	- Procaspasas en general	

Tabla III. Características generales de los miembros de la familia de las caspasas. Hasta el momento se han descrito 14 caspasas. Aquí se describen las caracterizadas hasta el momento.

La caspasa-8 está considerada como una de las iniciadoras más importantes en la muerte apoptótica inducida por el receptor de muerte CD95 (Fas/APO-1), sin embargo puede activar a todas las caspasas conocidas *in vitro* (Srinivasula et al., 1996) y se le considera como una de las iniciadoras más importantes en muchas formas de apoptosis.

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio fue la caracterización de la caspasa-2 en el modelo de muerte inducido por la estaurosporina, en donde la participación de esta caspasa, juega un papel fundamental como iniciadora del proceso apoptótico. A continuación se describen las características más importantes de esta caspasa.

Caspasa-2

La caspasa-2 o Nedd-2 fue el primer homólogo de ICE/Ced-3 identificado. Nedd-2 es el homólogo en roedores de la caspasa-2 de humanos, su expresión aumenta en cerebro durante el desarrollo mientras que en el organismo adulto disminuye (Kumar et al., 1994). Numerosas evidencias indican que esta caspasa es un elemento clave en las vías de activación que llevan a la muerte apoptótica (Kumar et al., 1994; Harvey et al., 1997; Li et al., 1997). Se ha sugerido que esta caspasa podría actuar no sólo como un efector positivo de la muerte, sino también como un regulador negativo, dependiendo del tipo celular y/o del estado de maduración celular (Wang et al., 1994; Kumar et al., 1997; Bergeron et al., 1998).

Los mecanismos de acción de esta caspasa son complejos, existen dos isoformas generadas por procesamiento alternativo del transcrito primario (Wang et al., 1994), una de las cuales, la caspasa-2_L induce muerte neuronal, en tanto que la otra, la caspasa-2_S la inhibe. Ambas isoformas se presentan en igual concentración en el SN. La sobreexpresión de caspasa-2_S puede prevenir la muerte en líneas celulares de fibroblastos privados de factor trófico, sin embargo, es incapaz de inhibir a la caspasa-2_L.

Esta caspasa se ha considerado como iniciadora en células no neuronales (Li et al., 1997; Zhu et al., 2001; Grossmann et al., 2001). Esto debido en parte a las

características estructurales que presenta, como es la presencia de un largo prodominio que caracteriza a las caspasas iniciadoras como la -8 y la -9; este prodominio puede asociarse con la molécula adaptadora RAIDD (recruitment apoptotic initiator death domain). Sin embargo, existen muy pocas evidencias de la participación de la caspasa-2 como iniciadora en la muerte apoptótica de células neuronales (Butt et al, 1998). A pesar de no haberse identificado aún los sustratos endógenos de la caspasa-2 (Porter et al, 1997; Talanian et al, 1997) en modelos celulares neuronales, esta caspasa puede actuar principalmente como efectora en una cascada proteolítica iniciada por las caspasas-8 ó -9 (Van de Craen et al, 1999; Johnson et al, 2000; Shearwin et al, 2000; Shimohama et al, 2001). Se ha sugerido también que la caspasa-3 puede inducir la activación de la caspasa-2 (Muzio et al, 1998; Swanton et al, 1999).

El precursor de la caspasa-2 tiene una masa molecular de 48 kDa que al romperse genera 3 fragmentos de 32, 33 y 14 kDa, posteriormente se generan 2 subunidades, una de 18 kDa (p18) y otra de 12 kDa (p12). Se ha demostrado también que el precursor de esta caspasa se localiza tanto en citoplasma como en núcleo y que puede procesarse en ambos compartimentos (Colussi et al, 1998). Esto sugiere que la caspasa-2 puede funcionar como efectora.

Se tienen evidencias del papel de las caspasas en la muerte apoptótica en modelos *in vivo*. La mutación del gen de la caspasa-9, resulta en la muerte de embriones caspasa-9^{-/-}, y defectos en el desarrollo del cerebro de organismos caspasa-9^{-/-}, fenómenos asociados a la disminución de la muerte celular durante el desarrollo (Hakem et al, 1998).

La regulación de las caspasas puede darse a diferentes niveles y por distintas señales de muerte-sobrevivencia. Existe una familia de proteínas originalmente identificadas en el genoma de virus de insectos (Clen y Miller, 1994), cuyos homólogos en mamíferos inhiben la activación de las caspasas y la muerte neuronal inducida por diferentes estímulos. Estas moléculas se conocen como proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs) (Dereaux et al, 1997; Roy et al, 1997). La habilidad de las IAPs para regular la apoptosis en muchas especies radica en su capacidad de unirse e inhibir a algunas caspasas (Duckett et al, 1996;

Liston et al, 1996). En humanos XIAP, cIAP1 y cIAP2 son inhibidores directos de las caspasas-3, -6 y -7 (Devereaux et al, 1998). Una característica importante del mecanismo de acción de las IAPs es que no pueden inhibir el procesamiento catalítico de procaspasa-3 inducido por otras tales como la caspasa-8. Sin embargo, inhiben directamente a la caspasa-3 activada, bloqueando así otros eventos apoptóticos. Se ha demostrado también que las IAPs bloquean la activación de la caspasa-9 inducida por citocromo c, previniendo así la activación de las caspasas-3, -6 y -7 (Devereaux et al, 1998).

Todas estas moléculas actúan en forma ordenada y perfectamente coordinada regulando la muerte apoptótica a diferentes niveles, es decir, inhibiendo o activando el proceso apoptótico. Dado que las caspasas constituyen componentes centrales que regulan los mecanismos de este tipo de muerte en una gran variedad de tipos celulares, resulta interesante determinar si la muerte apoptótica de las células granulares de cerebelo (CGC) inducida *in vitro* está mediada por estas caspasas.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha sugerido recientemente que el tipo de muerte que ocurre durante el desarrollo de las células granulares de cerebelo (CGC) es de naturaleza apoptótica. Estas células requieren *in vitro* la presencia de altas concentraciones de potasio (25-40 mM) en el medio para diferenciarse y madurar, un evento que está determinado por la edad de las células. Existen evidencias que indican que estas células mueren apoptóticamente cuando son privadas de esta estimulación despolarizante (Galli et al, 1995; Ni et al, 1997; Chang et al, 1997; Morán et al, 1999). Se sabe que las CGC inician una dependencia de potasio alrededor del día 5 *in vitro*, que coincide con el tiempo en que estas células reciben *in vivo* la inervación de las fibras presinápticas musgosas provenientes de otras regiones del cerebro. Una proporción de estas fibras utilizan al ácido glutámico como neurotransmisor. Esto ha permitido sugerir que la despolarización inducida por el potasio mimetiza las influencias tróficas ejercidas *in vivo* por dichas fibras y que esta influencia es requerida durante un tiempo muy específico en el desarrollo (Balázs et al, 1988). En apoyo a esto, se ha visto que el NMDA, un agonista de los receptores glutamatérgicos incrementa la sobrevivencia de las CGC en un medio con concentraciones no despolarizantes de KCl. El efecto trófico inducido por la despolarización con potasio y el NMDA está mediado por un incremento en los niveles de calcio intracelular.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han permitido corroborar que el tipo de muerte que se presenta en este tipo de células durante el desarrollo es apoptótico, sin embargo hasta el momento no se ha podido establecer con precisión la secuencia de activación de las caspasas en este modelo. Recientemente hemos caracterizado el papel de la caspasa-3 durante el proceso de muerte apoptótica de las CGC. Se ha observado que una disminución en las concentraciones intracelulares de calcio citoplásmico induce un marcado incremento en la actividad de esta caspasa asociado a un aumento en la síntesis de su ARN mensajero y al procesamiento de la misma (Morán et al, 1999). Es probable que una vez inducido el proceso de muerte apoptótica en CGC se promueva la activación no sólo de

caspasa-3 sino de otras caspasas y todas en conjunto participen en la proteólisis de los distintos sustratos.

Recientemente se ha estudiado parte de la cascada de activación de caspasas en la muerte apoptótica de las CGC inducida por la privación de concentraciones despolarizantes de KCl (K5) (Gerhardt et al, 2001). Otros estímulos de muerte como la estaurosporina (STS), un inhibidor de amplio espectro de proteínas cinasas y potente inductor de muerte apoptótica (Boix et al, 1997; Posmantur et al, 1997), induce también la muerte por apoptosis de las CGC (Koh et al, 1995; Jacobson et al, 1996; Kronh et al, 1998). La STS también activa a algunas caspasas incluyendo la -3 (Taylor et al, 1997; Boix et al, 1997). Los procesos de sobrevivencia y muerte de las CGC están relacionados con la activación de vías de segundos mensajeros capaces de activar algunos tipos de cinasas, por lo que resulta interesante explorar el papel de la STS como inductor de muerte en este modelo celular. Otras condiciones como la exposición a ceramida, un componente de los esfingolípidos, también inducen muerte apoptótica en distintas preparaciones celulares (Mitoma et al, 1998; Ping et al, 1998; Cock et al, 1998; Goswami et al, 1999; Jagjit et al, 2000) incluyendo las CGC (Takayuki et al, 1999).

No se conocen con precisión los mecanismos involucrados en la muerte inducida por estos estímulos. Así, resulta interesante determinar si diferentes estímulos de muerte apoptótica pueden inducir diferentes vías de activación de caspasas en el mismo modelo, en particular las CGC.

HIPÓTESIS

Si las células granulares de cerebelo muestran características de muerte apoptótica en respuesta a diferentes estímulos *in vivo* e *in vitro*, y dado que se ha demostrado la participación de la caspasa-3, es posible que los tres estímulos de muerte utilizados en este estudio, involucren diferentes vías de activación de caspasas.

OBJETIVOS

- 1) Caracterizar morfológica y bioquímicamente el proceso de muerte que se observa en cultivos primarios de CGC inducida por estímulos diferentes como la privación de estimulación despolarizante, la estaurosporina y la ceramida.
- 2) Determinar y caracterizar el papel de algunas moléculas que participan el proceso de muerte apoptótica, en particular el de las caspasas-1, -2, -3, -8 y -9 en la muerte de estas neuronas inducida por estos estímulos.
- 3) Determinar la secuencia de activación de caspasas en la muerte de estas neuronas inducida por efecto de la privación de estimulación despolarizante (K5), ceramida y la estaurosporina, y determinar la cascada de activación de caspasas que se induce por tres estímulos diferentes en un mismo tipo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de cultivos primarios de CGC. Se utilizaron cultivos primarios de CGC de ratas Wistar de 8 días de nacidas (Morán y Patel, 1989). El medio de cultivo utilizado fue un medio basal Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Microlab), 25 mM de KCl, 2 mM de glutamina y una solución de penicilina-estreptomicina, 50U/ml y 50 µg/ml, respectivamente. La densidad celular fue de 1.5×10^6 . Para permitir la adherencia neuronal, las cajas fueron previamente tratadas con 5 µg/ml de poli-L-lisina durante 24 horas; 20 horas después se les agregó una solución de citosina arabinosa (10 mM) para evitar el crecimiento de células no neuronales (Balász et al., 1988). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ (5%) y aire saturado con vapor de agua (95%) (Morán y Patel, 1989). Después de 7 días *in vitro* (DIV), las células se sometieron a diferentes tratamientos para inducir muerte apoptótica. Un grupo de células se sometió a un cambio de medio, de KCl 25 mM (K25) a 5 mM (K5), otro grupo se mantuvo con altas concentraciones de potasio (K25) y se trató con estaurosporina (STS, 0.5 µM). Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos después de la aplicación de los tratamientos (1, 3, 8, 12 y 24 horas). En otros experimentos las células se incubaron con péptidos inhibidores de caspasas (YVAD-CHO, DEVD-CHO, VDVAD-CHO, IETD-CHO y LEHD-CHO para las caspasas-1, -3, -2, -8 y -9, respectivamente) junto con los diferentes estímulos apoptóticos utilizados en este estudio. Los péptidos se obtuvieron comercialmente (ver detalles en artículo).

Ensayo de sobrevivencia mediante la técnica del MTT. A los 7 DIV los cultivos de CGC se sometieron a los diferentes tratamientos para inducir muerte apoptótica (privación de estímulo despolarizante (K25-K5) o tratamiento con 0.5 µM de STS). A las 3, 8, 12, 24 y 48 horas, se realizó el ensayo para determinar la viabilidad celular; los cultivos se incubaron durante 45 minutos con el MTT (sal de tetrazolio 144 µM) a 37°C. Posteriormente, se procedió a aspirar el medio mediante vacío y se les adicionó 1 ml de DMSO al 100% en el cual se solubilizó el azul de formazán incorporado a las mitocondrias de las células vivas. Posteriormente y mediante un

espectrofotómetro se calculó la diferencia entre la absorbancia de la solución medida a 570 y 630 nm. Los resultados se expresaron como valores relativos del control.

Paralelo a estos experimentos se realizaron ensayos de MTT para conocer el efecto de inhibidores específicos de caspasas. A los 7 DIV y bajo las mismas condiciones experimentales ya descritas, los cultivos de CGC recibieron la aplicación de los estímulos de muerte utilizados en este estudio (cambio de medio de K25 a K5 o STS) y, simultáneamente, se sometieron al tratamiento con los diferentes péptidos inhibidores de caspasas a una concentración final de 10 μ M. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después de la aplicación de los tratamientos.

Los cultivos celulares se fotografiaron minutos antes de realizar los ensayos de determinación de viabilidad celular.

Determinación de condensación de núcleos en CGC (Tinción con Hoechst 33258). A los 7 DIV las CGC se sometieron a los distintos estímulos de muerte utilizados en este estudio. A diferentes tiempos (3, 8 y 12 horas), se lavaron las células con PBS y se incubaron con el colorante Hoechst (33258) (1 μ g/ml en PBS) por 15 minutos, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron nuevamente con PBS. Las preparaciones se observaron en un microscopio de luz invertido utilizando un filtro de fluorescencia, objetivo 40x.

Medición de actividad de caspasas. La actividad de las caspasas-2, -3, -1, -8 y -9 se midió utilizando sustratos fluorogénicos específicos para cada una de ellas: DEVD-MCA y IETD-MCA, para las caspasas-3 y -8 respectivamente; YVAD-MCA para la caspasa-1; VDAD-MCA y LEHD-MCA, para las caspasas-2 y -9 respectivamente, todos acoplados a metil cuumarina. Las células tratadas se lavaron con PBS y posteriormente se homogenizaron en un buffer que contiene 500 mM de HEPES, 5 mM de EDTA, 200 mM de EGTA, sacarosa al 12.5%, 1M de DTT y 0.1% de CHAPS, en presencia de 1 μ M de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 2 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml de pepstatina y 5 μ g/ml de leupeptina CGC. La actividad de caspasas se determinó por un método fluorogénico (Thornberry, 1994) en un espectrofluorómetro (Luminescence Spectrometer AMINCO-Bowman

Series2, programa de computadora Y-3057, versión 95) a una longitud de onda de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm.

Análisis de proteínas (Técnica del Western blot, WB). Una vez completados los tiempos de los tratamientos, las células se lavaron con PBS y homogenizaron en un buffer de lisis pH 7.4 que contiene 25 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, NonidetP-40 al 2%, SDS 0.2%, y una mezcla de inhibidores de proteasas; posteriormente se sonicaron y centrifugaron a 3,400 RPM (revoluciones por minuto) por 20 minutos a 4°C y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (8, 12 ó 15 %, dependiendo del tamaño del fragmento) en una dimensión de acuerdo al método de Laemmli (1970) en condiciones no desnaturalizantes (100 volts, 3 horas). Una vez concluida la electroforesis, los geles se transfirieron a filtros de PVDF y se bloquearon con un buffer de Tris-HCl/Tween 20 (TTBS) (100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 0.1% Tween, pH 7.5) conteniendo 5% de leche descremada por 3 horas a 4°C, posteriormente se lavaron con TTBS y se incubaron con los anticuerpos (obtenidos comercialmente, ver detalles en artículo) correspondientes a las diferentes proteínas a identificar; posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina. Los filtros se revelaron utilizando un sistema quimioluminiscente y se expusieron a películas Kodak XAR-5. La concentración de proteínas para cada experimento se determinó utilizando el método de Bradford (1976).

Técnica para la obtención de fracciones citosólicas y mitocondriales (Fraccionamiento celular). A los 7 DIV, las CGC se sometieron a los diferentes estímulos para inducir muerte apoptótica. A las 3, 6, 8, 12 y 24 horas después de la exposición a los diferentes tratamientos, las células se lavaron y se homogenizaron en un buffer para fraccionamiento celular que contiene 10 mM Tris-HCl, 0.3 mM de EGTA (ethylenebis(oxyethylenenitrilo)-tetra-acetic acid) y 0.25 M de sacarosa, pH 7.4. Los homogenados se centrifugaron a 4282.2 rpm (5,100 X g for) por 10 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 12,111 RPM (14,500 X g) por 30 minutos a 4°C para obtener una fracción

mitocondrial (pastilla) y una citosólica (sobrenadante). Las fracciones mitocondriales se resuspendieron en el buffer de homogenización. Posteriormente se determinaron los niveles de proteína de cada una de las fracciones para los experimentos de WB.

Análisis estadístico. Los datos están expresados como promedio \pm la desviación standard, y la significancia estadística de los datos obtenidos se determinó utilizando una ANOVA de una cola con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA PRIVACIÓN DE ESTIMULACIÓN DESPOLARIZANTES (K25-K5) Y ESTAUROSPORINA (STS) EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC

En estudios previos se ha observado que las CGC mantenidas durante 7-8 días *in vitro* (DIV) en un medio con concentraciones despolarizantes de KCl (25 mM; K25), mueren de manera apoptótica cuando son privadas de estimulación despolarizante (K5). Se ha observado que esta muerte depende de la concentración de KCl (Morán et al., 1999). Se sabe también que la STS induce la muerte de las CGC. Nosotros confirmamos aquí estos resultados previos y evaluamos el efecto de estos dos estímulos en la morfología de las CGC. A los 7 DIV, las CGC cultivadas en K25 presentan una gran densidad neuronal organizada en cúmulos compuestos por somas grandes y turgentes, interconectados por paquetes densos de procesos (Figura 2 de artículo). Cuando estas células se privaron de estimulación despolarizante, o bien, se sometieron al tratamiento con STS (0.5 μ M), se observó un proceso degenerativo en un gran porcentaje de la población neuronal que se hizo evidente 24 horas después de la aplicación de los estímulos (Figura 2 de artículo). En los cambios morfológicos observados bajo estas condiciones se pueden apreciar irregularidades en la membrana plasmática y adelgazamiento y fragmentación de los procesos. Después de 48 horas de la aplicación de ambos estímulos, los cultivos mostraron muy pocas neuronas en buen estado, una ausencia total de procesos y una gran cantidad de restos celulares.

Estos resultados se confirmaron al determinar la viabilidad celular a través de la transformación de la sal de tetrazolio en azul de formazán (MTT) por las CGC. Bajo condiciones de K5 y STS, encontramos una reducción en la viabilidad celular de aproximadamente un 50% a las 24 horas y de un 73% después de 48 horas, cuando fueron comparadas con el control (K25) (Figura 1 de artículo). También se observó que la muerte de las CGC inducida por STS, es dependiente

de la concentración (inserto). Cuando las CGC crecidas en un medio con concentraciones despolarizantes de KCl (K25) durante 7 DIV fueron tratadas con 0.05 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M o 1 μ M de STS por un período de 24 horas, la viabilidad celular se redujo en un 10, 30, 50 y 70%, respectivamente (Figura 1 de artículo, inserto). La STS utilizada a una concentración de 0.5 μ M indujo una disminución en la viabilidad celular de un 50 y 80% después de un periodo de 24 y 48 horas, respectivamente. Resultados semejantes se observaron con el K5, en donde a una concentración de 5 y 10 mM de KCl, se observó una disminución en la viabilidad celular del 80% en ambos casos, 24 horas después de la aplicación del tratamiento. La concentración de STS que se utilizó en este estudio para la inducción de la muerte fue de 0.5 μ M. Así mismo, los experimentos de privación de estimulación despolarizante se realizaron cambiando el medio de cultivo que contiene 25 mM de KCl, a uno con 5 mM de KCl.

EFFECTO DEL K5 Y LA STS EN LA CONDENSACIÓN DE MATERIAL NUCLEAR DE CGC

Estudios previos indican que la STS induce la condensación del material nuclear (Taylor et al 1997). Para confirmar que el proceso de muerte que se observa en las CGC bajo estas condiciones es de naturaleza apoptótica, se realizaron tinciones con el colorante fluorescente Hoechst 33258, que se une de manera selectiva al material nuclear. La figura 6 muestra el efecto del K5 y la STS en la condensación nuclear de las CGC a las 8 (A) y 12 (B) horas después de la aplicación de los tratamientos. Como puede observarse, a las 8 horas las células sometidas a los estímulos de muerte no presentan cambios importantes en el material nuclear en comparación con las células control, en tanto que a las 12 horas en presencia de K5 y/o STS, los núcleos de las células presentan condensación de cromatina, confirmando así los reportes previos que describen el fenómeno de muerte apoptótica en células granulares de cerebelo inducida por el K5 (D'Mello et al, 1993; Morán et al, 1999) y la STS (Taylor et al, 1997).

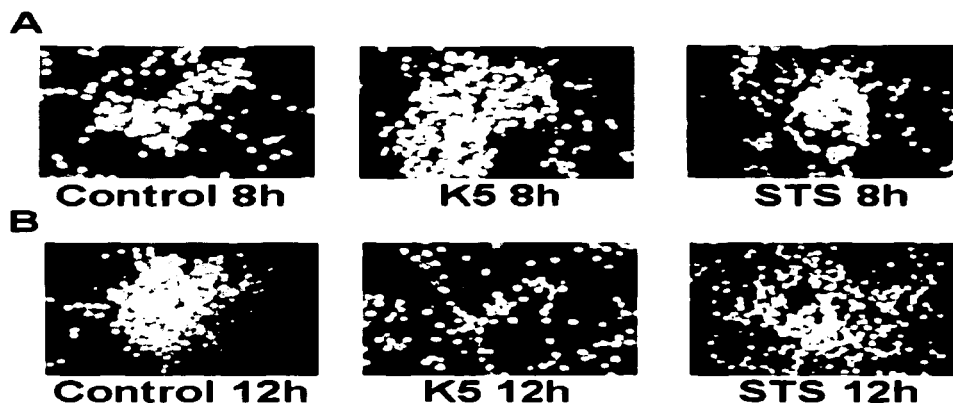


Figura 6. Efecto de la privación de estimulación despolarizante y la STS en la condensación del material nuclear de CGC en cultivo. Cultivos de CGC se sometieron al cambio de medio de K25 a K5 (A) o se trataron con STS (B) durante 8 y 12 h. Posteriormente se tiñeron con Hoechst 33258. Los cultivos muestran en ambos casos una población importante de células con la cromatina condensada 12 horas después de la aplicación de los tratamientos.

ACTIVACIÓN DE CASPASAS POR K5 Y STS

Actividad de Caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 se midió utilizando Ac-DEVD-MCA a diferentes tiempos (3, 8, 12 y 24 horas). Con la utilización de este sustrato fluorogénico, preferencialmente reconocido por la caspasa-3, se encontró que el máximo de actividad de esta caspasa se alcanza a las 12 horas después de la aplicación de ambos estímulos de muerte (Figura 3a de artículo), observándose un aumento en la actividad de la caspasa-3 desde las 8 horas. Después de 24 horas se observaron niveles cercanos a los medidos a las 3 horas. Estos resultados indican que ambos estímulos de muerte inducen la activación de la caspasa-3 con un curso temporal similar.

Para corroborar estos resultados, se evaluó la actividad de la caspasa-3 determinando el procesamiento de la proenzima mediante la técnica del WB,

utilizando las mismas condiciones experimentales (Figura 3b de artículo). A partir de las 3 horas después de la aplicación de ambos tratamientos se observó una banda de 17 kDa (p17) que corresponde al fragmento proteolíticamente activo de la caspasa-3, observándose un aumento en la intensidad de la banda a las 8-12 horas. Estos resultados se confirmaron midiendo la densidad de la banda de 17 kDa en cada uno de los tiempos analizados (Figura 3c de artículo). Uno de los sustratos endógenos de las caspasas mejor caracterizados es PARP, sin embargo, la proteólisis de esta enzima inducida por estas proteasas, genera fragmentos de diferentes tamaños dependiendo de la caspasa responsable de esta proteólisis. Existen evidencias que indican que la caspasa-3 induce la fragmentación de una gran cantidad de proteínas en núcleo y citoesqueleto, muchas de las cuales ya se han identificado, entre las cuales se encuentra PARP (ver tabla III), una enzima cuyo peso molecular es de 116 kDa, se sabe que la proteólisis de PARP por caspasa-3 induce un fragmento de 85 kDa, en diferentes tipos celulares (Tewari et al, 1995; Bursztajn et al, 2000; Kwon et al, 2002). Para confirmar la participación de la caspasa-3 en este estudio, se determinaron los niveles de fragmentación de PARP. Los WB obtenidos en estos experimentos mostraron una banda de 85 kDa en células tratadas con STS y en células sometidas a la privación de estímulo despolarizante (K25-K5) a partir de las 8 horas (Figura 3d del artículo). Estos datos confirman la participación de la caspasa-3 de manera similar en la muerte apoptótica de CGC inducida por ambos estímulos.

Actividad de caspasa-8. Existen evidencias que indican que la caspasa-3 puede ser activada por las caspasas-8 y -9 ante diferentes estímulos de muerte. Para determinar si algunas de éstas pueden ser activadas por los estímulos de muerte utilizados en este estudio, y para determinar si alguna de ellas es responsable de la fragmentación y activación de la caspasa-3, se midieron las actividades de ambas caspasas. En el caso de la caspasa-8, se utilizó el péptido Ac-IETD-MCA, preferencialmente reconocido por esta caspasa. Los resultados mostraron una ligera activación alrededor de las 6-8 horas después de la aplicación de ambos

estímulos (K25-K5 y STS) (Figura 4a de artículo). Sin embargo, son notables los niveles basales de actividad de esta caspasa en las células control (K25), en donde se esperarían niveles basales bajos, como es el caso de las otras caspasas medidas en este estudio. Encontramos una reducción en la actividad, con respecto al control, a las 3 horas de exposición con los tratamientos seguida por un pequeño incremento en la actividad. Después de 24 horas la actividad de esta caspasa inducida por ambos estímulos disminuyó.

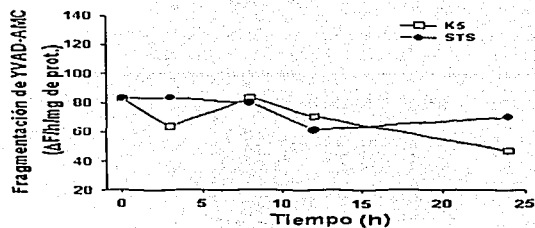
Para confirmar estos resultado, se analizó el procesamiento de la caspasa-8 mediante la técnica del WB. Los resultados obtenidos (Figura 4b de artículo) mostraron una banda de 20 kDa (p20) que corresponde al fragmento activo de esta caspasa en CGC tratadas con STS o privadas de la estimulación despolarizante, y en todos los tiempos en los cuales se llevaron a cabo las determinaciones. Los niveles basales de fragmentación (K25) fueron evidentes y parecen no modificarse por los tratamientos utilizados para inducir la muerte apoptótica. Estos resultado se confirmaron al medir la densidad de la banda de 20 kDa en cada uno de los tiempos analizados (Figura 4c de artículo).

Actividad de caspasa-9. Para determinar los niveles de activación de la caspasa-9 se utilizó el péptido Ac-LEHD-MCA, reconocido preferencialmente por esta caspasa. En este caso se observó un aumento en la fragmentación de esta caspasa inducido por ambos estímulos, siendo mayor el efecto de la STS (Figura 5a de artículo) que tuvo un máximo de activación a las 8 horas de exposición con STS. El máximo de activación se obtuvo a las 8 horas después de la aplicación de los tratamientos. Estos resultados muestran que ambos estímulos pueden inducir la activación de la caspasa-9. Así mismo, los resultados obtenidos al determinar los niveles de fragmentación (Figura 5b de artículo), muestran el fragmento activo de esta caspasa (p10). Estos resultados fueron confirmados al medir la densidad de la banda de 10 kDa (Figura 5c de artículo).

Actividad de Caspasa-1. Los niveles de activación de la caspasas-1 se midieron utilizando el péptido Ac-YVAD-AMC, reconocido preferencialmente por esta

caspasa. Los resultados obtenidos no mostraron ningún cambio en los niveles de activación de esta caspasa en ninguno de los tiempos medidos (Figura 7A y B). Estos resultados se confirmaron al determinar los niveles de fragmentación de caspasa-1 mediante WB. Ninguno de los dos estímulos indujo la activación de esta caspasa (datos no mostrados).

A



B

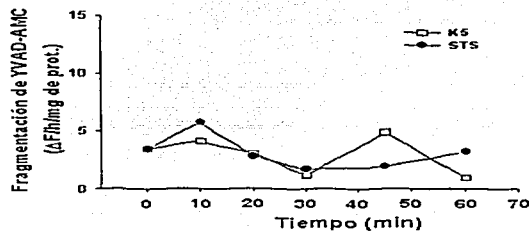


Figura 7. Curso temporal de activación de caspasa-1. A) Cultivos de CGC se sometieron a los diferentes estímulos de muerte (K25-K5 o STS), la actividad de la caspasa-1 se determinó mediante el rompimiento del sustrato fluorogénico YVAD-AMC a las 3, 8 12 y 24 h después de la aplicación de los tratamientos. B) Determinación de los niveles de fragmentación del sustrato fluorogénico YVAD-AMC en homogenados de CGC a los 10, 20, 30, 45 y 60 minutos después de la aplicación de los estímulos de muerte. Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actividad de Caspasa-2. Existen evidencias que indican que la STS induce la activación de la caspasa-2 en diferentes tipos celulares y que esta caspasa puede activar a la caspasa-3. Para determinar si este fenómeno de activación secuencial puede inducirse en el modelo de las CGC, se midió la activación de la caspasa-2 utilizando el péptido Ac-VDVAD-AMC. Los resultados mostraron que la STS indujo la activación de esta caspasa 3 horas después de la aplicación del tratamiento (Figura 6a de artículo), teniendo un máximo de activación a las 8 horas; el K5 indujo también el rompimiento del sustrato Ac-VDVAD-MCA, teniendo un máximo a las 12 horas después de la aplicación del estímulo, sin embargo, el incremento observado en la actividad de esta caspasa bajo estas condiciones, fue menor que el obtenido en el caso de la STS.

Para determinar la activación de la caspasa-2 bajo estas condiciones experimentales, se analizó el procesamiento de la proenzima mediante WB. Durante la fragmentación y activación de la caspasa-2, la procaspasa endógena sufre 3 rompimientos, generando 3 fragmentos de 33, 32 y 14 kDa que posteriormente se procesan generando dos fragmentos enzimáticamente activos uno de 18 kDa y otro de 12 kDa. La figura 6b (ver artículo) muestra uno de los fragmentos activos que se generan por efecto de la STS (p18) en los homogenados de CGC. Este fragmento se observó entre las 3 y las 12 horas de exposición con STS. Sin embargo, para el caso del K5, no fue posible detectar ninguno de los dos fragmentos activos que se generan al inducir la activación de la caspasa-2 (p18 o p12), en ninguno de los tiempos analizados. Así mismo, se midió la densidad de la banda de 18 kDa (Figura 6c de artículo), en donde es claro el aumento en los niveles de proteína del fragmento activo p18 de caspasa-2, inducido por STS.

Translocación de citocromo c. Se ha propuesto que uno de los mecanismos relacionados a la fragmentación y activación de la procaspasa-9, es la translocación del citocromo c de la mitocondria al citosol. La figura 7a (ver artículo) muestra que el K5 indujo una disminución en los niveles de esta proteína en la fracción mitocondrial de CGC, teniendo niveles de reducción máximos a las 8 horas después de la

privación del estímulo despolarizante, en tanto que en la fracción citosólica los niveles de citocromo c se incrementaron ligeramente alrededor de este tiempo (Figura 7b de artículo). Para el caso de la STS, los resultados mostraron una marcada reducción en los niveles de citocromo c de la fracción mitocondrial 6 horas después de la aplicación de la STS, estos cambios correlacionaron con el incremento a las 6 horas, en los niveles de citocromo c de la fracción citosólica de las CGC.

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS CASPASAS EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC.

Para confirmar el papel de las caspasas analizadas en la muerte apoptótica de las CGC inducida por K5 y STS, se estudió el efecto de inhibidores específicos de caspasas en la morfología y en la sobrevivencia de las CGC (ver métodos). Las figuras 9a y 9b (ver artículo) y muestran la morfología de las CGC sometidas a los estímulos de muerte utilizados en este estudio (K25-K5 y STS) y el efecto de los diferentes inhibidores de caspasas en la muerte apoptótica de estas células. A las 24 horas después de la aplicación de los tratamientos, los cultivos de CGC mostraron una gran cantidad de células muertas en comparación con las células control (K25); en el caso de las células privadas de estímulo despolarizante (Figura 9a de artículo), esta muerte fue inhibida de manera significativa al bloquear la actividad de la caspasa-9 (K5+LEHD-CHO), después de 24 horas de aplicación de los tratamientos, en tanto que el efecto de los péptidos inhibidores DEVD-CHO y IETD-CHO, que bloquean preferencialmente la activación de las caspasas-3 y -8, respectivamente, no tuvieron un efecto importante (K5+DEVD-CHO y K5+IETD-CHO). El péptido inhibidor de la caspasa-2 (K5+VDVAD-CHO) no tuvo ningún efecto en la inhibición de la muerte celular de los cultivos con K5. En el caso de las células tratadas con STS+VDVAD (Figura 9b de artículo), la morfología de los cultivos mostró un aspecto muy similar al observado en las células control; el péptido inhibidor de la caspasas-9 inhibió también la muerte celular de los cultivos, en tanto que los inhibidores de las caspasas-3 y -8 no inhibieron el proceso de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muerte inducido por la STS en la morfología de las CGC. Estos resultados fueron confirmados al determinar la viabilidad celular (MTT) de las CGC bajo estas condiciones experimentales (Figura 8a y 8b de artículo).

Dado que en ambos modelos de muerte es clara la participación de la caspasa-3, se evaluó el efecto de cada uno de los inhibidores de estas caspasas en combinación con el inhibidor de la caspasa-3, en la muerte apoptótica de las CGC inducida por K5 y STS (Figura 8), para determinar el papel de las caspasas iniciadoras (-2, -9 y -8) que se activan bajo estas condiciones experimentales, en la activación de la caspasa-3. En el caso de las células mantenidas durante 24 horas con los inhibidores LEHD/DEVD-CHO, la degeneración celular, inducida por el K5, fue inhibida de manera significativa, mientras que las combinaciones de los inhibidores IETD/DEVD-CHO y VDVAD/DEVD-CHO, no tuvieron un efecto importante en la inhibición de la degeneración. Para el caso de la STS, las combinaciones de los inhibidores VDVAD/DEVD-CHO y LEHD/DEVD-CHO, mostraron un efecto importante inhibiendo la muerte inducida por el estímulo de muerte. Nuevamente, la combinación de los inhibidores IETD/DEVD-CHO, no indujo ningún cambio importante.

Así mismo y para determinar el efecto de los péptidos inhibidores sobre la caspasa-3, se determinaron los niveles de activación de estas caspasas en homogenados de CGC tratadas con K5+/-IETD-CHO, K5+/-VDVAD-CHO, K5+/-LEHD-CHO, K5+/-DEVD, STS+/-IETD-CHO, STS+/-VDVAD-CHO, STS+/-LEHD-CHO y STS+/-DEVD por 10 horas (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos indican que la caspasa-9 inhibe de manera significativa la activación de caspasa-3 inducida por K5, en tanto que el inhibidor de la caspasa-2 tiene efectos importantes inhibiendo la actividad de esta caspasa cuando se induce por STS. Estos resultados confirman la existencia de una activación secuencial de caspasas y la participación de diferentes vías de caspasas inducidas por dos estímulos diferentes, el K5 y la STS, en un mismo modelo celular.

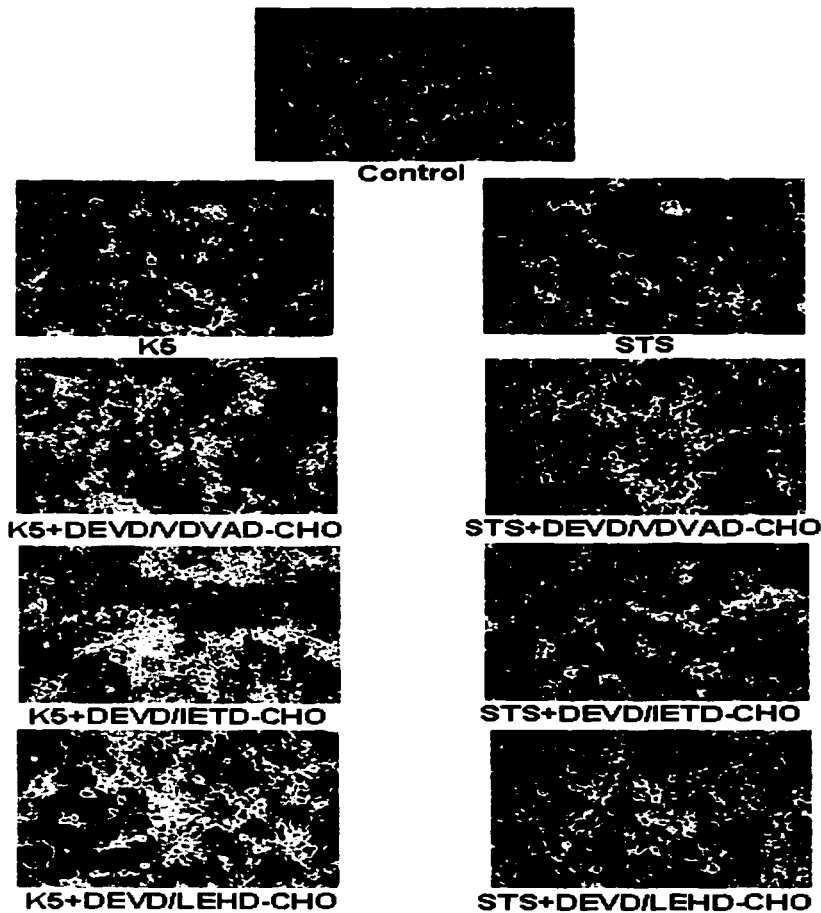


Figura 8. Efecto de diferentes combinaciones de inhibidores de caspasas en la morfología de las CGC. Los cultivos de CGC se sometieron a los diferentes tratamientos (K25-K5, STS) y se incubaron durante 24 h con los diferentes inhibidores de caspasas. Los datos mostrados son representativos de 5 experimentos diferentes.

ANEXO

EFFECTO DE LA C2-CERAMIDA EN LA MUERTE APOPTÓTICA DE LAS CGC

El objetivo central de este trabajo fue caracterizar las vías de activación de caspasas que se inducen por estaurosporina (STS) y K5 durante la MCP de las CGC. Estos estudios muestran que ambos estímulos inducen la MCP mediante un mecanismo apoptótico que involucra la activación de caspasas y la liberación del citocromo c. Sugerimos también que en la vía de activación de caspasas inducida por STS la caspasa-2 podría activarse en las fases iniciales, en tanto que en el caso del K5, la caspasa-9 parece ser la que inicia la cascada de activación de estas proteasas.

Paralelo a estos estudios se realizaron experimentos para determinar si un tercer estímulo de muerte promueve el proceso apoptótico y la activación de caspasas en el mismo tipo celular, las CGC.

La ceramida, un componente importante de los esfingolípidos, principalmente de la esfingomielina, pertenece a un grupo de segundos mensajeros que regulan una gran cantidad de procesos celulares. Su papel como molécula intracelular efectora de MCP de tipo apoptótico se ha estudiado en diversos tipos celulares (Mitoma et al, 1998; Ping et al, 1998; Cock et al, 1998; Goswami et al, 1999; Jagjit et al, 2000). La C2-ceramida es un análogo de la ceramida endógena y se ha utilizado ampliamente como inductor de MCP de tipo apoptótico; en CGC se sabe que este proceso apoptótico es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de la C2-ceramida y del grado de maduración celular (Takayuki et al, 1999).

En este estudio se realizaron experimentos en los cuales se utilizó la C2-ceramida como estímulo de muerte en cultivos primarios de CGC. Así mismo, se midieron los niveles de activación de diferentes caspasas para determinar su participación durante el proceso de muerte de estas células. Para ello se utilizaron cultivos primarios de CGC de rata Wistar de 8 días de nacidas (DPN) (ver detalles en Materiales y Métodos, pag. 33). A los 7 DIV, las células mantenidas con altas concentraciones de KCl se sometieron al tratamiento con C2-ceramida (40 μ M).

Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos después de la aplicación de los tratamientos (6, 8, 12, 24, 28, 32, 40, 44 y 48 horas). Se determinó el efecto de la C2-ceramida en la morfología y viabilidad celular a través de la técnica del MTT, y se evaluó el efecto de un inhibidor general de caspasas (ZVAD-CHO) en la inhibición de la muerte celular inducida por C2-ceramida. Se midió la actividad de las caspasas-3, -2, -8 y -9 a diferentes tiempos, para ello se utilizaron sustratos específicos para cada una de ellas. Así mismo, se determinaron los niveles de fragmentación para detectar los fragmentos activos de cada una de ellas mediante la técnica del western blot (WB) bajo las mismas condiciones experimentales (ver detalles en Materiales y Métodos).

RESULTADOS

EFFECTO DE LA C2-CERAMIDA EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS CGC

En este estudio se determinó el efecto de la C2-ceramida en la morfología y viabilidad celular de las CGC. A los 7 DIV, las CGC crecidas en un medio con K25 fueron tratadas con C2-ceramida a una concentración de 40 μM por un período de 24 y 48 horas. La figura 1A muestra la morfología de las CGC, en donde puede observarse que 24 horas después de la aplicación del tratamiento, la morfología de estas células no muestra cambios importantes con respecto al control (K25); sin embargo, a las 48 horas se observó un proceso degenerativo importante. Así mismo, el inhibidor general de caspasas, Z-VAD, inhibió significativamente la muerte de las CGC 48 horas después de la aplicación del tratamiento (Figura 1A). Estos resultados se confirmaron al determinar la viabilidad celular mediante la técnica del MTT (Figura 1B); 24 horas después de la aplicación de diferentes concentraciones de C2-ceramida (3 μM , 10 μM , 30 μM , 40 μM y 60 μM) se observó una disminución en la viabilidad celular del 20% en el caso de las CGC tratadas con 30 y 40 μM (Figura 1B). A una concentración de 60 μM , la viabilidad celular se redujo en un 50%. A las 48 horas se observó una disminución de la

viabilidad de aproximadamente 25% a una concentración de 3 y 10 μM y de 60% a 30 μM . A concentraciones mayores de C2-ceramida (40 y 60 μM) se observó una disminución en la viabilidad de aproximadamente 70 y 90%, respectivamente (Figura 1B). La concentración de C2-ceramida que se utilizó en este estudio para la inducción de la muerte fue de 40 μM .

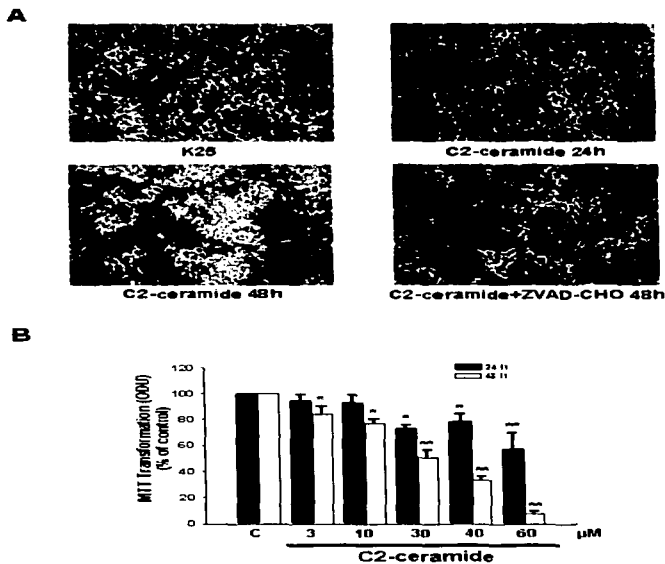


Figura 1. Efecto de la C2-ceramida en la morfología y muerte celular de las CGC. A) A los 7 DIV los cultivos primarios se trataron con la C2-ceramida y fueron observados en un microscopio de contraste de fases y fotografiados a las 24 y 48 horas después de la aplicación del tratamiento. El cultivo que permaneció con K25 (control) presenta células con somas grandes y procesos gruesos. Así mismos, 24 horas después las células tratadas con C2-ceramida presentan un aspecto semejante al de las células control. La degeneración celular, que se manifiesta con el encogimiento de los somas y la destrucción de los procesos, se hizo evidente a las 48 horas, un fenómeno que fue inhibido por el péptido ZVAD-CHO, inhibidor general de caspasas. **B)** Efecto de diferentes concentraciones de C2-ceramida en la supervivencia de las CGC, la cual se evaluó a las 24 y 48 horas después de la aplicación del tratamiento como transformación de MTT. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 4 experimentos diferentes. Barra = 50 μM .

Se realizaron también experimentos para determinar el tipo de muerte promovido por la C2-ceramida mediante la determinación de la fragmentación del material nuclear, mediante la extracción de ADN de CGC sometidas al tratamiento de muerte, y su visualización en geles de agarosa, así como a través de la inmunodetección de las formas activas de las caspasas-3 y -9, a través de ensayos inmunohistoquímicos (datos no mostrados). Esto permitió caracterizar el tipo de muerte promovido por la C2-ceramida, que muestra cambios morfológicos importantes de tipo apoptótico.

ACTIVACIÓN DE CASPASAS POR C2-CERAMIDA

Actividad de caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 se midió utilizando el sustrato fluorogénico DEVD-MCA a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24, 28, 32, 40, 44 y 48 horas). Dados los antecedentes centrales de este trabajo, se utilizaron células tratadas con STS o sometidas a la privación de estimulación despolarizante (K25-K5), como control positivo de activación de caspasas.

Las mediciones realizadas entre las 3 y las 10 horas después de la aplicación de la C2-ceramida, no mostraron cambios importantes en los niveles de activación de la caspasa-3 (datos no mostrados). La figura 2A de este anexo muestra los niveles de activación de la caspasa-3 a partir de las 12 horas después de la aplicación del estímulo de muerte, en donde se observó un aumento significativo entre las 12 y las 32 horas. Posteriormente los niveles de esta caspasa disminuyen. Estos resultados se confirmaron al determinar el procesamiento de la proenzima de caspasa-3 y la generación del fragmento activo (p17) en homogenados celulares mediante WB. Los resultados obtenidos muestran el fragmento activo de esta caspasa 12 horas, detectándose también a las 24, 28 y 36 horas posteriores a la aplicación de la C2-ceramida (Figura 2B). Estos resultados se confirmaron al medir la densidad de la banda del fragmento activo, así como a través de la determinación de los niveles de fragmentación de PARP, en donde se detectó un fragmento de 85 kDa (Figura 2C). Estos resultados

inician la participación de la caspasa-3 durante la muerte apoptótica de las CGC inducida por la C2-ceramida.

Actividad de caspasa-9. La activación de la caspasa-9 se determinó utilizando el sustrato fluorogénico LEHD-MCA. En los tiempos en los cuales se realizaron las mediciones de actividad de caspasa-9, detectamos un aumento importante 12 horas después de la aplicación de la C2-ceramida, el cual se mantuvo hasta las 32

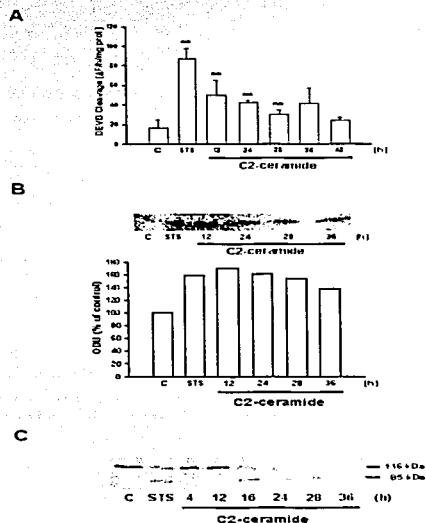


Figura 2. Efecto de la C2-ceramida en la activación y fragmentación de caspasa-3 en CGC. A los 7 DIV cultivos primarios de CGC fueron tratados con 40 μ M de C2-ceramida. **A)** curso temporal de activación de caspasa-3. La fragmentación de esta caspasa se determinó mediante el procesamiento del sustrato fluorogénico DEVD-AMC a diferentes tiempos después de la aplicación del tratamiento. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 4 experimentos diferentes. * ($p < 0.01$); ** ($p < 0.001$). **B)** Curso temporal de fragmentación de la caspasa-3 detectado mediante la técnica del WB. Las bandas corresponden al fragmento activo de esta caspasa (p17); en la gráfica se muestra el análisis densitométrico de esta banda (ver detalles en Materiales y Métodos) y es representativa de 4 diferentes experimentos. **C)** Curso temporal de fragmentación de PARP inducido por C2-ceramida en CGC. Las flechas indican una banda de 116 kDa que corresponde al tamaño normal de esta enzima, y una banda de 85 kDa, que representa un producto de la proteólisis de la misma inducida por caspasa-3.

horas, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar valores similares al control (Figura 3A). Para confirmar la participación de la caspasa-9 en el proceso de muerte inducido por la C2-ceramida, se determinaron los niveles de fragmentación de esta caspasa mediante la técnica del WB. Los resultados muestran la fragmentación de la proenzima que se detectó mediante la aparición de un fragmento de 10 kDa, que corresponde al fragmento activo de esta caspasa (Figura 3B). La banda correspondiente al fragmento activo se observó desde las 3 horas, detectándose hasta 32 horas después de la aplicación del tratamiento, disminuyendo posteriormente. Estos resultados se confirmaron al hacer la medición densitométrica del fragmento p10 (Figura 3B).

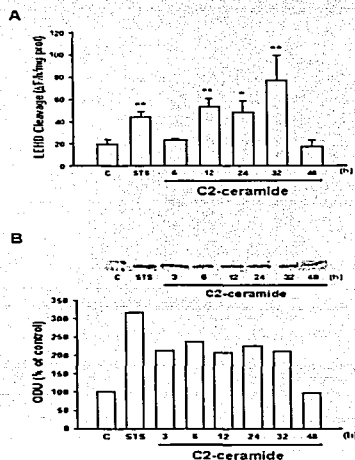


Figura 3. Efecto de la C2-ceramida en la activación y fragmentación de la caspasa-9 en CGC. A los 7 DIV cultivos primarios de CGC fueron tratadas con 40 µM de C2-ceramida. **A)** Curso temporal de activación de caspasa-9 determinado mediante el rompimiento del sustrato fluorogénico LEHD-AMC a diferentes tiempos después de la aplicación del tratamiento. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar de 4 experimentos diferentes. *($p < 0.01$); **($p < 0.001$). **B)** Curso temporal de fragmentación de la caspasa-9 detectado mediante la técnica del WB. Las bandas corresponden al fragmento activo de esta caspasa (p10); en la gráfica se muestra el análisis densitométrico de esta banda (ver detalles en Materiales y Métodos) y es representativa de 4 diferentes experimentos.

Translocación de citocromo c. Se ha demostrado ampliamente que la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol es uno de los mecanismos celulares asociados a la activación de la proenzima de la caspasa-9. En este estudio determinamos los niveles de citocromo c en fracciones citosólicas y mitocondriales de CGC sometidas al estímulo de muerte. La figura 4B muestra la presencia de citocromo c en la fracción citosólica de las CGC a las 12 y 24 horas después de la aplicación de la C2-ceramida, disminuyendo notablemente en la fracción mitocondrial (Figura 4A); 36 horas después no se detectó la presencia de la proteína en la fracción mitocondrial, apareciendo de manera notable en la fracción citosólica. A las 48 horas, los niveles de citocromo c declinaron en ambas fracciones.

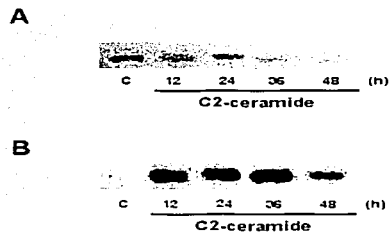


Figura 4. Efecto de la C2-ceramida en el proceso de translocación del citocromo c de la mitocondria al citosol en CGC. A los 7 DIV las células mantenidas con altas concentraciones de KCl, se trataron con 40 μ M de C2-ceramida. Las fracciones celulares se obtuvieron a partir de homogenados totales de CGC como se describe en Materiales y Métodos. En el WB se muestran los niveles de citocromo c en las fracciones mitocondrial (A) y citosólica (B).

Actividad de caspasas-2 y -8. Para determinar la participación de otras caspasas en este modelo de muerte, y para definir su papel dentro de la cascada de activación de caspasas, se midieron los niveles de activación de las caspasas-2 y -8 en homogenados de CGC. La actividad de estas caspasas se midió utilizando el péptido VDVAD-MCA en el caso de la caspasa-2 y IETD-MCA en el caso de la caspasa-8. En la figura 5A se muestra el curso temporal de activación de la caspasa-2, donde puede observarse un ligero aumento entre las 24 y 32 horas. Sin embargo, la fragmentación de la proenzima, detectada por WB por la aparición de una banda de 18 kDa, que corresponde a uno de los fragmentos activos de esta caspasa, aparece en cada uno de los tiempos en los cuales se realizó el análisis (8, 12, 24, 28, 32, 40, 44 y 48 horas) (Figura 5B). Estos resultados se confirmaron al medir la densitometría de la banda.

En la figura 6A se muestran los niveles de activación de la caspasa-8, en donde se observa una actividad alta en las células control (K25), sin detectarse un aumento importante en ninguna de las condiciones experimentales y en ninguno de los tiempos medidos. Similarmente, en los resultados obtenidos a partir de la determinación de los niveles de fragmentación de la caspasa-8, mediante la técnica del WB, se muestra una banda de 20 kDa que corresponde al fragmento activo de esta caspasa, la cual es evidente en todos los tiempos en los cuales se realizó el ensayo (Figura 6B). Esta banda se detectó también en las células control, y en las células tratadas con STS (10 horas). Al realizar la medición densitométrica de la banda, no se detectaron cambios en ningún caso.

EFEECTO DE LOS INHIBIDORES DE CASPASAS EN LA MORFOLOGÍA Y SOBREVIVENCIA DE LAS DE LAS CGC

Los resultados obtenidos indican que la C2-ceramida induce MCP de tipo apoptótico en CGC, y que este proceso está mediado por la activación de las caspasas. Para confirmar la participación de estas proteasas durante este proceso de muerte, y para determinar su papel en la cascada apoptótica activada por la C2-ceramida, se estudió el efecto de los inhibidores de las caspasas-2, -3, -8 y -9.

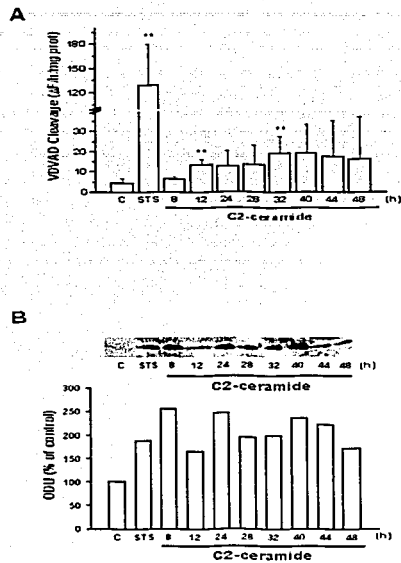


Figura 5. Efecto de la C2-ceramida en la activación y fragmentación de la caspasa-2 en CGC. A los 7 DIV cultivos primarios de CGC fueron tratadas con 40 μ M de C2-ceramida. **A)** Curso temporal de activación de caspasa-2 determinado mediante el rompimiento del sustrato fluorogénico VDVAD-AMC a diferentes tiempos después de la aplicación del tratamiento. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 3 experimentos diferentes. *($p < 0.01$); **($p < 0.001$). **B)** Curso temporal de fragmentación de la caspasa-2 detectado mediante la técnica del WB. Las bandas corresponden al fragmento activo de esta caspasa (p18); en la gráfica se muestra el análisis densitométrico de esta banda (ver detalles en Materiales y Métodos) y es representativa de 4 diferentes experimentos.

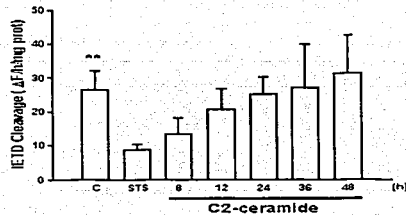
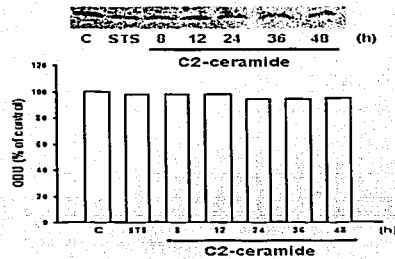
A**B**

Figura 6. Efecto de la C2-ceramida en la activación y fragmentación de la caspasa-8 en CGC. A los 7 DIV cultivos primarios de CGC fueron tratadas con 40 μ M de C2-ceramida. **A)** Curso temporal de activación de caspasa-8 determinado mediante el rompimiento del sustrato fluorogénico IETD-AMC a diferentes tiempos después de la aplicación del tratamiento. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar de 4 experimentos diferentes. * ($p < 0.01$); ** ($p < 0.001$) **B)** Curso temporal de fragmentación de la caspasa-8 detectado mediante la técnica del WB. Las bandas corresponden al fragmento activo de esta caspasa (p20); en la gráfica se muestra el análisis densitométrico de esta banda (ver detalles en Materiales y Métodos) y es representativa de 4 diferentes experimentos.

La figura 7 muestra la morfología de las CGC tratadas simultáneamente con 40 μM de C2-ceramida y DEVD-CHO (inhibidor de caspasa-3), LEHD-CHO (inhibidor de caspasa-9, VDVAD-CHO (inhibidor de caspasa-2) o IETD (inhibidor de caspasa-8). Los cultivos se fotografiaron a las 48 horas después de la aplicación de los tratamientos. En el caso de las células tratadas con los inhibidores de las caspasas-3 y -9, la morfología de los cultivos mostraron un aspecto muy similar al observado en las células control, con somas grandes y procesos celulares fuertes. Esto indica que estas caspasas son importantes inductores del proceso de muerte de las CGC producido por C2-ceramida. El inhibidor de la caspasa-2 tuvo un efecto parcial de protección contra la muerte, en tanto que el inhibidor de la caspasa-8 no tuvo ningún efecto en el proceso degenerativo del cultivo inducido por C2-ceramida.

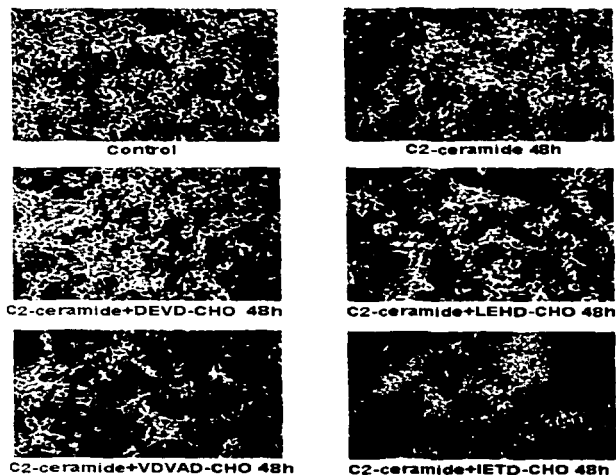


Figura 7. Efecto de diferentes inhibidores de caspasas en los cambios morfológicos de las CGC inducidos por la C2-ceremida. A los 7 DIV los cultivos se sometieron al tratamiento con C2-ceramida y simultáneamente se aplicaron los diferentes inhibidores de caspasas: DEVD-CHO, LEHD-CHO, VDVAD-CHO, IETD-CHO (inhibidores de caspasa-3, -9, -2 y -8, respectivamente). Los cultivos se observaron y fotografiaron y 48 horas después. Barra= 50 μM .

Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo del Dr. José Rodríguez A. del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Los datos serán publicados próximamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La muerte celular programada (MCP) o apoptosis es un proceso involucrado en una gran cantidad de eventos fisiológicos tales como la eliminación de células supernumerarias durante el desarrollo embriológico y el mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Participa también en procesos patológicos como enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas.

El estudio y caracterización de las moléculas que participan en la muerte apoptótica ha permitido entender con mayor detalle los mecanismos que son responsables de este fenómeno. Las moléculas mejor descritas y caracterizadas de este proceso hasta el momento son las proteínas que pertenecen a la familia de las caspasas (Chen et al, 1998; Ni et al, 1998). Se sabe que un grupo de caspasas actúa como iniciador de una cascada proteolítica que lleva a la activación de otras caspasas que funcionan como efectoras de las señales iniciales (Kumar 1995; Frasen y Evan, 1996; Cohen 1997; Salvesen et al, 1997).

En este estudio se utilizaron tres estímulos diferentes para inducir la muerte apoptótica de las CGC, la privación de estimulación despolarizante (K25-K5), STS y C2-ceramida; los resultados obtenidos claramente indican que estos estímulos inducen la activación de caspasas, la cual se evaluó utilizando sustratos fluorogénicos específicos. Se analizó también la fragmentación y formación de enzimas proteolíticamente activas de las caspasas mediante la técnica del WB.

Una de las conclusiones de este trabajo es que la caspasa-1 no participa en el proceso de muerte de las CGC activado por el K5, confirmando así los resultados obtenidos previamente (Morán et al, 1999). La STS tampoco tuvo efecto sobre la activación de esta caspasa. Otro estudio realizado en neuronas de hipocampo muestra una clara activación de caspasa-1 inducida por STS, pero sólo a tiempos muy cortos de exposición, sugiriendo que esta caspasa funciona como iniciadora en este modelo. Sin embargo, en este trabajo no se detectó ningún aumento en la activación de la caspasa-1 en ninguno de los tiempos medidos (3, 8, 12 y 24 horas; 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 minutos). Tampoco fue posible detectar el fragmento activo, confirmando que la caspasa-1 no participa en la cascada de

activación de caspasas ni en la muerte apoptótica de las CGC. Es probable que la misma señal tenga diferentes efectos dependiendo del tipo celular.

Como se ha demostrado en estudios previos (Armstrong et al, 1997; Ni et al, 1997; D'Mello et al, 1998; Marks et al, 1998; Morán et al, 1999), nuestros resultados muestran que el K5 induce la activación de la caspasa-3 en CGC. De manera similar, la STS fue capaz de activar a la caspasa-3 con un curso temporal similar, siendo evidente a partir de las 8 horas y teniendo un máximo de activación a las 12 horas después de la aplicación de los tratamientos. Así, en ambos casos es clara la participación de la caspasa-3 y su actividad proteolítica en sustratos endógenos como PARP.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio es la activación de la caspasa-2 por STS. Se ha sugerido que esta caspasa se activa por el rompimiento catalítico entre las subunidades pequeña y grande y posteriormente por un rompimiento adicional entre la subunidad grande y el prodominio (Li et al, 1998). El prodominio parece ser necesario para el reclutamiento de caspasas hacia complejos específicos de muerte (Colussi et al, 1998). Es posible que la caspasa-2 tenga la capacidad de autoprocresarse, como ya se ha propuesto. Por otro lado, basándose en los cursos temporales de activación y aparición del fragmento activo de las caspasas-2 y -3, inducidas por STS, es evidente que la caspasa-3 se activa después de que se ha generado la activación de la caspasa-2. Esto indica que la caspasa-2 es la responsable de la activación de la caspasa-3, sin embargo, la caspasa-9 parece tener también un papel importante durante el proceso de activación de la caspasa-3. Por otro lado, el K5 induce una ligera activación de esta caspasa, sin embargo los niveles de activación son menores cuando se comparan con los inducidos por la STS. Los resultados obtenidos mediante el WB muestran la aparición de uno de los fragmentos activos de la caspasa-2 sólo en el caso de las células tratadas con STS. Esto podría sugerir que la caspasa-2, en el modelo del bajo potasio no tiene un papel relevante en la muerte de las CGC, y que la activación observada bajo estas condiciones, sea atribuida a otra caspasa, no identificada en este estudio, que reconoce al péptido sintético utilizado para determinar la actividad de caspasa-2.

Así, los resultados que aquí se reportan sugieren que la muerte apoptótica inducida por la STS, activa una vía diferente de señalización a la promovida por la privación de estímulo despolarizante, en donde la caspasa-9 parece tener un papel importante como responsable de la activación de la caspasa-3 y de la muerte apoptótica de las CGC inducida por este estímulo. La STS induce también la activación y fragmentación de la caspasa-9, sin embargo ambos procesos se dan después de que se ha activado la caspasa-2. Estos resultados han sido confirmados al analizar el efecto de diferentes inhibidores de caspasas en la muerte apoptótica de las CGC, en donde el péptido inhibidor de la caspasa-2, revierte de manera notable la degeneración del cultivo inducida por la STS, 24 horas después de la aplicación del estímulo. Así, bajo estas condiciones, la apariencia de los cultivos es muy similar a la observada en las condiciones control (K25). El péptido inhibidor de la caspasa-9 tiene efectos importantes sobre los cambios morfológicos inducidos por la STS, sin embargo, el efecto de los inhibidores de caspasa-2+caspasa-3 en la degeneración celular promovida por este estímulo, fue más efectivo en inhibir este proceso que la combinación de los inhibidores de caspasa-9+caspasa-3. Esto se confirmó posteriormente al determinar la viabilidad celular de las CGC.

En el caso del K5, el inhibidor de la caspasa-9 indujo una protección importante contra la degeneración del cultivo producida por el tratamiento, la cual se corroboró al determinar la viabilidad celular. Esta protección fue también observada al probar el efecto del inhibidor de la caspasa-3 junto con el inhibidor de la caspasa-9; por otro lado, en los cultivos que fueron tratados con el péptido inhibidor de la caspasa-2 no se observa ninguna protección contra la degeneración del cultivo inducida por el estímulo de muerte, siendo ésta muy similar a la de las células que se mantuvieron únicamente con K5, de igual forma, estas observaciones se confirmaron mediante ensayos de viabilidad celular.

El inhibidor de la caspasa-3 no indujo cambios muy importantes en la apariencia de los cultivos sometidos a los estímulos de muerte ya mencionados, esto confirma el papel de esta caspasa, como efectora, en las vías de muerte activadas en estos modelos.

En el caso de la STS es clara la participación de la caspasa-2 como iniciadora de la cascada de activación de caspasas, mientras que para el caso del K5 la caspasa-9 es la responsable de iniciar este proceso, como se ha observado en otros modelos. Un dato importante de este estudio que apoya estas observaciones, es el hecho de que el inhibidor de la caspasa-2 bloquea, de manera significativa, la actividad de la caspasa-3 inducida por STS, mientras que en el caso del K5 la actividad de la caspasa se reduce marcadamente por el inhibidor de la caspasa-9.

En este estudio se exploró también la posibilidad de que la liberación del citocromo c formara parte del programa de muerte inducido por K5 y STS. Los resultados obtenidos mediante la técnica del WB muestran un aumento significativo en los niveles de citocromo c de la fracción citosólica de CGC, inducido por ambos estímulos, siendo mayor en el caso de la STS. Estos resultados confirman la participación de la caspasa-9 y del citocromo c en la muerte de las CGC sugerida en otros estudios (Liu et al, 1996; Cai et al, 1998; Bossy-Wetzel et al, 1998; Krajewski et al, 1999).

Se sabe que todas las caspasas se activan cuando la proenzima sufre un procesamiento catalítico que puede producirse por autocatálisis, como es el caso de las caspasas iniciadoras, un proceso de activación característico de las proteasas en general. Las caspasas efectoras, blanco específico de las iniciadoras, catalizan la proteólisis de sustratos proteicos en citosol y núcleo, generando así los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas. El procesamiento de la proenzima generalmente produce dos subunidades proteolíticamente activas, una grande y otra pequeña (Stennicke et al, 1999). Se sabe también que los zimógenos de las caspasas se encuentran normalmente en la célula y que tienen un umbral de activación que puede estar controlado por moléculas que inhiben una posible activación (Thornberry, 1998).

En este estudio se determinó la participación de la caspasa-8 durante la muerte apoptótica de las CGC. Sin embargo, aún no es posible definir su papel en ninguno de los dos modelos que se han utilizado para inducir este proceso de muerte. Es importante hacer notar que en las células control, los niveles de

activación de esta caspasa son considerablemente altos y que esta activación disminuye 3 horas después de la aplicación de los estímulos de muerte, posteriormente se observa un ligero aumento en los niveles de actividad alrededor de las 8-12 horas. Este fenómeno fue exclusivo para esta caspasa. Estos resultados se confirmaron en el análisis de inmunoblot (WB) de caspasa-8, donde se observó el fragmento activo de esta caspasa en los homogenados de las células control y en todos los tiempos de exposición a los dos estímulos de muerte. Así mismo, no se observaron efectos del péptido inhibidor de esta caspasa en la morfología y sobrevivencia de las CGC expuestas a los estímulos de muerte.

La proenzima o zimógeno de la caspasa-8 posee un ~1% de actividad basal; se ha hipotetizado que esta activación basal es suficiente para inducir el rompimiento de varias moléculas de la procaspasa-8 (caspasa sin actividad proteolítica) y generar el fragmento catalíticamente activo (Stennicke et al, 1999). En este estudio nosotros sugerimos algunas posibilidades que podrían explicar los altos niveles de activación de caspasa-8 en las CGC mantenidas con potasio alto (K25), estímulo que mantiene a las células en condiciones óptimas y en donde normalmente se detectan niveles basales muy bajos de otras caspasas: 1) que los niveles de activación basal de la procaspasa-8 en este modelo, sean mayores a los observados en otros tipos celulares. En muchos modelos se ha descrito la participación de la caspasa-8 en la muerte apoptótica asociada a la activación de los miembros de la familia de receptores a TNF que promueven este tipo de muerte. Cuando las células reciben un estímulo de muerte, la caspasa-8 se fragmenta, ya sea por autocatálisis o por interacción con moléculas de otras caspasas iniciadoras, como es el caso de las caspasas-2 ó -9, que pueden promover el rompimiento proteolítico de la caspasa-8; 2) la caspasa-8 podría ser no sólo un efector positivo de muerte, sino que podría estar involucrada en otro evento celular induciendo la sobrevivencia neuronal. Los resultados obtenidos a partir de este estudio, sugieren que la caspasa-8 no participa de manera importante en la muerte de las CGC inducida por STS y K5.

Estudios previos indican que la ceramida participa en una gran cantidad de procesos celulares, activados en respuesta a diferentes estímulos externos. Recientemente se ha demostrado que esta molécula puede inducir la MCP de tipo apoptótico en varios tipos celulares (Mizushima et al, 1996; Boesen-de Cock et al, 1998; Lièvre-mont et al, 1998; Ping et al, 1998; Kilkus et al, 1999; Dawson et al, 1999; Gill et al, 2000; Monti et al, 2001). La C2-ceramida, un análogo sintético de la ceramida endógena ha sido ampliamente utilizado para la inducción de la muerte apoptótica.

En este estudio determinamos el efecto de este compuesto con el fin de caracterizar el tipo de MCP inducido por éste en CCG, así como la participación de las caspasas durante el proceso. Estudios previos muestran que las CGC mueren apoptóticamente por efecto de la C2-ceramida sólo en estados tempranos del desarrollo *in vitro* (Takayuki et al, 1999). En otro estudio se muestra que la C2-ceramida promueve la MCP en cultivos maduros de CGC (7 DIV), 24 horas después de la aplicación del tratamiento (Monti et al, 2001), sin que quede clara la participación de las caspasas. En nuestro estudio el efecto tóxico de la C2-ceramida se observa 48 horas después de la aplicación del tratamiento. Es importante mencionar que en el estudio de Monti et al. (2001), el protocolo para la inducción de la MCP incluye el tratamiento de la C2-ceramida en cultivos primarios sometidos simultáneamente a la privación de suero. En nuestro estudio, los tratamientos con C2-ceramida se realizaron en cultivos mantenidos con un medio de cultivo que contenía suero y altas concentraciones de KCl.

Por otro lado, realizamos experimentos para caracterizar el tipo de MCP inducido por la C2-ceramida; así, pudimos determinar algunos de los cambios morfológicos promovidos por la C2-ceramida (datos no mostrados). En este trabajo caracterizamos parte de la vía de activación de moléculas proapoptóticas que participan en el proceso apoptótico, como en el caso de las caspasas-3 y -9, las cuales se activan significativamente y parecen tener un papel importante en este modelo de muerte. Por otro lado, determinamos la participación del citocromo c, que se detectó en la fracción citosólica de las CGC desde las 12 horas después de la aplicación del tratamiento, disminuyendo notablemente en la fracción

mitocondrial a lo largo del tiempo. En el caso de otras caspasas como la -2, pudimos detectar una ligera activación a partir de las 12 horas y hasta las 32 horas aproximadamente. Sin embargo, los niveles de fragmentación de esta caspasa mostraron la aparición de uno de sus fragmentos activo (p18) en todos los tiempos en los que se llevó a cabo el ensayo. Este fenómeno se observó también en el caso de la caspasa-8 donde la banda correspondiente al fragmento activo de esta caspasa (p20), fue evidente aún en las células control mantenidas con altas concentraciones de KCl. Nosotros sugerimos que la caspasa-2 se activa en este modelo sin tener un papel determinante en la muerte, en tanto que las caspasas-3 y -9 son fundamentales, ya que al inhibir su activación, se inhibe la muerte inducida por la C2-ceramida. Para el caso de la caspasa-8, nuestros resultados sugieren que no participa durante el proceso apoptótico. Resultados similares se encontraron durante la muerte apoptótica inducida por el bajo potasio (K5) y la STS.

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio es el aparente retraso en el proceso de muerte de las CGC promovido por la C2-ceramida, dado que los cambios morfológicos degenerativos más importantes se detectaron a las 48 horas después de la aplicación del tratamiento. Así mismo, la activación de las caspasas-3 y -9 se mantuvo más allá de las 24 horas de tratamiento con la C2-ceramida. Esto significa que el estímulo utilizado en este estudio puede inducir diferentes mecanismos celulares durante la MCP de las CGC, y que sólo hemos detectado a algunas de las moléculas que participan en la fase tardía del proceso apoptótico. Esto indica que la ceramida podría inducir diferentes procesos moleculares en distintos tipos celulares como las neuronas cerebelares.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio proponemos un modelo en el cual se representan las vías de activación de caspasas inducidas por tres diferentes estímulos inductores de MCP:

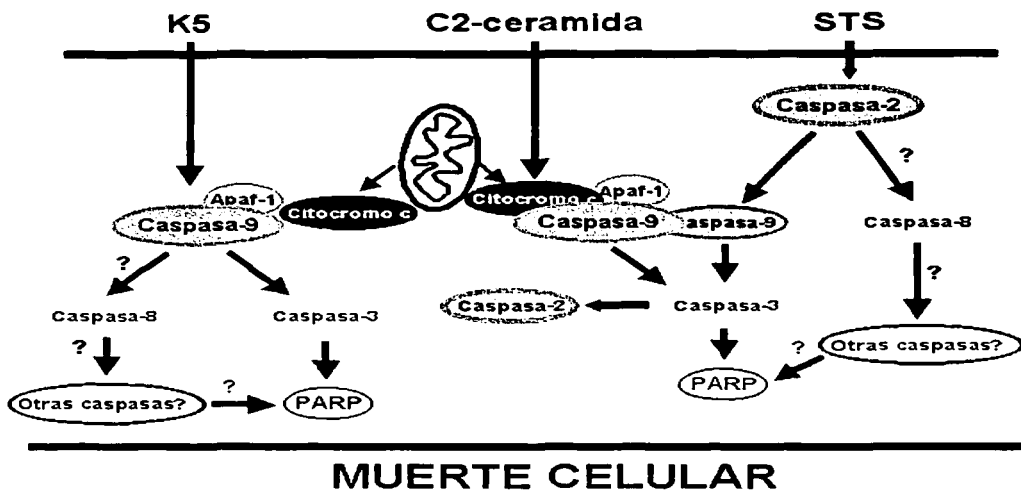


Figura 9. Posibles vías de activación de caspasas durante la muerte apoptótica de las CGC inducida por K5, C2-ceramida y estaurosporina (STS). La liberación del citocromo c es un evento comúnmente ligado a la fragmentación y activación de la procaspasa-9, la cual induce a su vez la fragmentación de la caspasa-3 que proteolisa varias proteínas en núcleo y citoesqueleto, como en el caso de PARP. Esta es la vía de activación de caspasas activada por el K5 y la C2-ceramida, que en este último caso presenta un retraso temporal en la ejecución de la maquinaria apoptótica de las CGC. Por otro lado la STS promueve la activación de una vía de caspasas que se inicia por la caspasa-2, la cual promueve la activación de la caspasa-3 y posiblemente de la caspasa-9.

RESUMEN DE RESULTADOS

- Las CGC en cultivo sufren un proceso de muerte con características apoptóticas cuando son privadas de estimulación despolarizante (K25-K5) o bajo la acción de la estaurosporina (STS) y C2-ceramida.
- Estos tres estímulos promueven la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol con una cinética similar.
- La muerte apoptótica inducida por estos estímulos está mediada por la activación secuencial de caspasas, siendo evidente la participación de las caspasa-3 y -9 en los tres modelos.
- Ninguno de los tres estímulos promueve la activación de la caspasa-1 durante la muerte de las CGC.
- La STS, pero no el K5, induce la activación de la caspasa-2, que tiene un papel preponderante como iniciadora del proceso activando a la caspasa-3 y, posiblemente a la caspasa-9. En el caso de la C2-ceramida la caspasa-2 tiene una participación marginal durante el proceso apoptótico.
- La caspasa-8 no tiene un papel bien definido durante el proceso apoptótico de las CGC en ninguno de los tres modelos de muerte, ya que el péptido inhibidor no produce efectos importantes de inhibición de la degeneración de los cultivos; tampoco tiene efecto en la sobrevivencia de los cultivos en ninguna de las dos condiciones de muerte.
- El efecto de los inhibidores de caspasas en la muerte apoptótica de las CGC, inducida por estos estímulos, bloquea la muerte neuronal apoptótica y confirma así la participación secuencial de las caspasas durante este proceso.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que tres diferentes estímulos de muerte, el K5, la STS y la C2-ceramida, inducen la activación de diferentes vías de caspasas en un mismo modelo celular, en este caso las CGC. Para el caso del K5, es evidente la participación de la caspasa-

9 como iniciadora del proceso y responsable de la activación y fragmentación de la caspasa-3, en tanto que para el caso de la STS, la caspasa-2, considerada como efectora en muchos modelos celulares, juega un papel central como iniciadora de la cascada de activación de las proteasas activadas por este estímulo. Así mismo, en el caso de la C2-ceramida, las caspasas-3 y -9 parecen ser las principales promotoras del proceso apoptótico, en donde la caspasa-2 no participa de manera importante.

REFERENCIAS

- Altman, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. *J. Comp. Neur.* 145, 465-514 (1972)
- Armstrong, R., Aja, T., Hoang, K., Gaur, S., Bai, X., Alnemri, E., Litwack, G., Karanewsky, D., Fritz, L. y Tomaselli, K. Activation of the CED/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* 17(2):553-562 (1997)
- Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulations. *Science* 281(5381): 1305-1308 (1998)
- Balázs, R., Jorgensen, O. y Hack, N. N-metyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* 27(2), 437-451 (1988)
- Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi L., Sun, J., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C.M., Hara, H., Moskowitz, M.A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, L.J. y Yuan, J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 12:1304-1314 (1998)
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976)
- Boix, J., Llecha, N., Yuste, V.J. y Comella, J.X. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacol.* 36: 811-821(1997)
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. y Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MPRT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-815 (1996)
- Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D.D. y Green, D.R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs uostream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17:37-49 (1998)
- Bursztajn, S., Feng, J.J., Berman, S.A. y Nanda, A. Poly (ADP-ribose) polymerase induction of apoptosis in human neuroblastoma. *Brain. Res. Mol.* 29:76(2):363-376 (2000)
- Butt, J.A., Harvey, L.N., Parasivan, G. y Kumar, S. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the predomain and the carboxyl-terminal regions. *J. Biol. Chem.* 273:6763-6768 (1998)

Cai, J., Yang, J. y Jones, D. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366:139-149 (1998)

Chang, J. y Wang, J.-Z. Morphological and biochemical changes during programmed cell death of rat cerebellum granule cells. *Neurochem. Res.* 22(1):43-48 (1997)

Cheng, E., Kirsh, D., Clem, R., Ravi, R., Kastan, M., Bedi, A., Veno, K. y Hardwick, J. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector of caspases. *Science* 278(5345):1966-1968 (1997)

Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Stetler, R.A., Zhu, R.L., Graham, S.H. y Simon, R.P. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 18:4914-4928 (1998)

Clem, R., Cheng, E., Karp, C., Kirsch, D., Veno, K., Takahashi, A., Kastan, M., Griffin, D., Earnshaw, W., Velivona, M. Y Hardwick, J. Modulation of cell death by bcl-xL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2), 554-559 (1998)

Clem, R.J. y Miller, L.K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:5212-5222 (1994)

Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *J. Biochem.* 326:1-16 (1997)

Colussi, A.P., Harvey, L.N. y Kumar, S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. *J. Biol. Chem.* 273:24535-24542 (1998)

Cosulich, S.C., Worrall, V., Hege, P.J., Green, S. y Clarke, P.R. Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr. Biol.* 12:913-920 (1997)

Chinnaiyan, A.M. y Dixit, V.M. True cell-death machine. *Curr. Biol.* 6:555-562 (1996)

Chou, J.J., Matsuo H., Duan, H. y Wagner G. Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 94:171-180 (1998)

Devereaux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. y Reed, J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304 (1997)

Dawson, G. Mechanism of apoptosis in embryonic cortical neurons (E6 and E7) in cultured involve lipid signaling protein phosphorylation and caspase activation. *Int. J. Devl Neuroscience.* 18:247-257 (2000)

Devereaux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. y Reed, J.C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO J.* 17:2215-2223 (1998)

DeLong, M. R. The cerebellum in Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (eds.). *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, Inc. USA. pp. 832-852 (2000)

D'Mello, S.R., Aglieco, F., Roberts, M.R., Borodetz, K. y Haycock, J.W. A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K deprivation. *J Neurochem* 70:1809-1818 (1998)

Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W. y Dixit, V.M. ICE-LAP6, a novel member of ICE/Ced gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol. Chem.* 271:16720-16724 (1996)

Duckett, S.D., Nava, E.V., Gedrich, W.R., Clem, J.R., Van Longen, L.J., Gilfillan, C.R., Shiels, H., Hardwick, M.J. y Thompson, B.C. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus *iap* gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO J.* 15(11):2685-2694 (1996)

Enari, M., Shakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. y Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50 (1998)

Fraser, A. y Evan G. A license to kill. *Cell* 85:781-784 (1996)

Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T., Calissano, P. y Schettini, G. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci* 15(2):1172-1179 (1995)

Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R. y Jorgensen, O. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7(7):2203-2213 (1987)

Garthwaite, G. y Garthwaite, J.J. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slice: dependence on calcium concentration. *Neurosci. Lett.* 66:193-198 (1986)

Gerhardt, E., Kügler, S., Leist, M., Beier, C., Berliocchi, L., Volbracht, C., Weller, M., Bähr, M., Nicotera, P. y Schulz, J.B. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol. Cel. Neurosci.* 17:717-731 (2001)

Goswami, R., Kilkus, J., Dawson, S.A. y Dawson G. Overexpression of Akt (protein kinase B) confers protection against apoptosis and prevents formation of ceramide in response to pro-apoptotic stimuli. *J. Neurosci. Research.* 57:884-893 (1999)

Grossmann, J., Walther, K., Artinger, M., Kiessling, S. y Schölmerich, J. Apoptosis signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 12:147-155 (2001)

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. y Mak, T.W. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94(3):339-352 (1998)

Harvey N., Butt, J. A. y Kumar, S. Functional activation of Need-2/ICH-1 (caspase-2) in an early process in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:13134 (1997)

Hengartner, M.O. Programmed cell death in invertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6(1):34-38 (1996)

Hu, S., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G. y Dixit, V.M. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 273(45):29648-53 (1998)

Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776 (2000)

Ito, M. The cerebellum and neural control. Raven Press, New York, pp 12 (1984)

Jacobson, B.A. Rothstein, T.L. y Marshak-Rothstein, A. The role of Fas/FasL. Interactions in the regulation of B cell function. *Behring. Inst. Mitt.* 97:185-199 (1996)

Jagjit, S.G. y Windebanck, J.A. Ceramide initiates NF κ B-mediated caspase activation in neuronal apoptosis. *Neurobiol. Disease* 7:448-461(2000)

Johnson, V.L., Ko, S.C., Holmstrom, T.H., Eriksson, J.E. y Chow, S.C. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological during chemical-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 113:2941-2953 (2000)

Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R.C., Kuzumaki, N. Y Tsujimoto Y. A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8532-8537 (1998)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kerr, J.F. y Harmon, B.V. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective in Tomei, L.D. y Cope, F.O. (eds.). *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. pp 5-29 (1991)

Koh, J.Y., Wie, M.B., Gwang, B.J., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Demaro, J., Csernansky, C. y Choi, D.W. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp. Neurol.* 135:153-159 (1995)

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chuck, McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. y Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298 (1997)

Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M., Welsh, K., Xie, Z., Devereaux, Q.L., Salvesen, G.S., Bredesen, D., Rosenthal, R.E., Fiskum, G. y Reed, J.C. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5752-5757 (1999)

Krohn, J.A., Preis, E. y Prehn, M.H.J. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J. Neurosci.* 18:8186-8197 (1998)

Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N.G. y Jenkins, N.A. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* all death gene *ced-3* and the mammalian IL-beta-converting enzyme. *Genes Dev.* 8:1613-1626 (1994)

Kumar, S. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 384:368-372 (1995)

Kwon, R.B., Park, E.K., Ryu, D.G. y Park, B.H. D4-GD1 is cleaved by caspase-3 during daunorubicin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Exp. Mol. Med.* 31:34(1):32-37 (2002)

Lievremont, J.-P., Sciorati, C., Morandi, E., Paulocci, C., Bunone, G., Della Valle, G., Meldolesi, J. y Clementi E. The p75^{NTR} - induced apoptotic program develops through a ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide

Liu, X., Kim, C.N., Pohl, J. y Wang, X. Purification and characterization of an interleukin-1 β -converting enzyme family protease that activates cysteine proteases P35 (CPP32). *J. Biol. Chem.* 271:13371-13376 (1996)

Li, H., Bergeron, L., Cryns, V., Pasternack, S.M., Zhu, H., Shi, L., Greenberg, A.Y. y Yuan, J. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:21010-21017 (1997)

Li, L., Prevette, D., Oppenheim, R.W. y Milligan, C.E. Involvement of specific caspases in motoneuron cell death in vivo and in vitro following trophic factor deprivation. *Mol. Cell Neurosci.* 12 :157-167 (1998)

Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeba, J.-E., MacKenzie, A. y Korneluk, E.G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353 (1996)

Mashima, T., Naito, M., Kataoka, S., Kawai, H. y Tsuruo, T. Aspartate-based inhibitor of interleukin-1 β -converting enzyme prevents antitumor agent-induced apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209(3):907-915 (1995)

Marks, N., Berg, J.M., Guidotti, A. y Saito, M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 52:334-341 (1998)

Monti, B., Zanghellini, P. y Contestabile A. Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. *Neurochem. Int.* 39:11-18 (2001)

Morán, J. y Patel, A. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Dev. Brain Res.* 46:97-105 (1989a)

Morán, J., Itoh, T., Reddy, R.U., Chen, M., Alnemri, S.E. y Pleasure, D. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73:568-577 (1999)

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63 (1983)

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. y Dixit, M.V. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930 (1998)

Ni, B., Wu, X., Du, Y., Su, Y., Hamilton-Byrd, E., Rockey, P.K., Rosteck, P. Jr., Poirier, G.G. y Paul, S.M. Cloning and expression of a rat brain interleukin-1 β converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role of apoptosis of cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 17:1561-1569 (1997)

Ni, B., Wu, X., Su, Y., Stephenson, D., Smalstig, E.B., Clemens, E.J. y Paul, S.M. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:248-256 (1998)

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.-T., Yu, V.L. y Miller, D.K. Identification and inhibition of the ICE/Ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43 (1995)

Nikonova, L.V., Beletsky, I.P. y Umansky, S.R. Properties of some nuclear nucleases of rat thymocytes and their changes in radiation-induced apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 215(3):893-901 (1993)

Oppenheim, P.W., Cell death during development of the nervous system. *Annu. Res. Neurosci.* 14,453-501 (1991)

Orth, K., Chhinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J. y Dixit, V.M. The CED-3/ICE-like protease Mch₂ is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem.* 271:16443-16446 (1996)

Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. y Tschopp, J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* 12(1):371-377 (1993)

Ping, S.E. y Barrett, G.L. Ceramida can induce cell death in sensory neurons, whereas ceramide analogues and sphingosine promote survival. *J. Neurosci. Res.* 54:206-213 (1998)

Pitzer, F., Dantes, A., Fuchs, T., Baumeister, W., y Amsterdam, A. Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. *FEBS Lett.* 394(1):47-50 (1996)

Porter, A.G., Nig, P. y Janicke, R.U. Death substrate comes alive. *Bioassays* 19:501-7 (1997)

Posmantur, R., McGinnis, K., Nadimpalli, R., Gilbertsen, R.B. y Wang, K.K. Characterization of CPP-32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 68:2328-2337 (1997)

Purves, D. y Lichtman, J. Principles of neural development. Sinauer Associates, Inc. USA. p. 433 (1995)

Reed, J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 124:1-6 (1994)

Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A. y Becker, J.W. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3(7):619-625 (1996)

Roy, N., Devereaux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. y Reed, J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914:6925 (1997)

Rudel, T. y Bokoch, G.M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276(5318):1571-1574 (1997)

Sakahira, H., Enari, M. y Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96-99 (1998)

Salvesen S.G. y Dixit M.V. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446 (1997)

Seol, D.-W. Y Billiar T.R. A caspase-9 variant missing the catalytic site in a endogenous inhibitor of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274(4):2072-2076 (1999)

Shearwin-Whyatt, L.M., Harvey, N.L. y Kumar, S. Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptador RAIDD. *Cell Death Differ.* 7:155-165 (2000)

Shimohama, S., Tanino, H. y Fujimoto, S. Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:1063-1066 (2001)

Sotelo, C. y Changeux, J.P. Bergmann fibers and granular cell migration in the cerebellum of homozygous weaver mutant mouse. *Brain Res.* 77(3):484-491 (1974)

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandez-Alnemri, T., Litwack, G. y Alnemri, E.S. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiples ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14486-14491 (1996)

Stennicke, H.R., Devereaux, G.L., Humke, W.E., Reed, C.J. y Dixit, M.V. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274:8359-8362 (1999)

Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P. y Woodman, P. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene* 18:1781-1787 (1999)

Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. y Wong, W.W. Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272:9677-9682 (1997)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Taniwaki, T., Yamada, T., Asahara, H., Ohyagi, Y. y Kira, J. Ceramide induces apoptosis to immature cerebellar granule cells in culture. *Neurochemical Res.* 24:685-690 (1999)

Taylor, J., Gatchalian L.C., Keen G. and Rubin L.L. Apoptosis in cerebellar granule neurons: involvement of interleukin-1 β converting enzyme-like proteases. *J. Neurochem.* 68:1598-1605 (1997)

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvensen, G.S. y Dixit, V.M. Yama/ CPP32 β , a mammalian homologue of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 81:801-809 (1995)

Thornberry, N.A., Bull, H., Calaycay, J., Chapman, R., Howard, A., Kostura, M., Miller, D., Molineaux, S., Weidner, J. y Aunins, J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774 (1992)

Thornberry, N.A. Interleukin-1beta converting enzyme. *Meth. Enzymol.* 244:615-631 (1994)

Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316 (1998)

Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W. y Vandenameele, P. The proteolytic procaspase activation network: an *in vitro* analysis. *Cell Death Differ.* 6:1117-1124 (1999)

Walker, R.P., Weaver, V.M., Lach, B., Leblanc, J. y Sikorska, M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp. Cell Res.* 213:100-106 (1994)

Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. y Yuang, J. Ich-1 an Ice/Ced3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739-750 (1994)

Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L. y Ham, J. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neuroscience.* 18:751-762 (1998)

Wood, K., Dispasquale, B. y Youle, R. In situ labeling of granule cells for apoptosis associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellu. *Neuron* 11:621-632 (1993)

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. y Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413 (1997)

Zhu, J., Nozell, S., Wang, J., Jiang, J., Zhou, W. y Chen, X. P73 cooperates with DNA damage agents to induce apoptosis in MCF7 cells in a p73 dependent manner. *Oncogene* 20:4050-4057 (2001)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caspase Activation Pathways Induced by Staurosporine and Low Potassium: Role of Caspase-2

Andrea Caballero-Benítez and Julio Morán*

Department of Neuroscience, Institute of Cellular Physiology, National University of Mexico, México

Apoptotic death is a physiological process with regulatory mechanisms that are under the control of different molecules such as caspases. These are classified as initiators, such as caspases-8 and -9, and effectors, such as caspases-3 and -7. The participation of caspase-2 in the effector phase of apoptosis has been commonly observed in many cell types; however, it is able to act as an initiator caspase, depending on the apoptotic stimulus. Cerebellar granule cells (CGCs) undergo apoptosis when they are transferred from high potassium (K25) to low potassium (K5); this process seems to be mediated by caspase-3 activation. Staurosporine (STS), a full strength inhibitor of kinase proteins, also induces apoptosis in these cells. To characterize the caspase cascade induced by two stimuli in the same cell type we studied the activation of different caspases in CGCs treated with STS or K5. We found that both K5 and STS induce the activation of caspase-3. This result was confirmed by the proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), an endogenous caspase-3 substrate. Caspase-2 was activated preferentially by STS, which showed a temporal course suggesting that this caspase was induced before caspase-3. The initiator caspase-9 was also activated by both K5 and STS, as well as cytochrome-c release. The results obtained in this study suggest that STS and K5 induced different activation caspase pathways for apoptotic cell death of CGCs. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: apoptosis; cerebellar granule neurons; cytochrome-c; caspase-2

Apoptosis is characterized by morphological and biochemical changes that involve specific proteolysis of a subset of proteins, mediated by a group of cysteine proteases known as caspases (Thornberry et al., 1992). Caspases are normally present in cells as zymogens with a low basal activity that become active after being processed into smaller fragments (Nicholson and Thornberry, 1997; Salvesen and Dixit, 1997). Caspases may undergo self-cleavage (Fauchet et al., 1995; Munday et al., 1995) or be activated by other caspases, thus initiating a cascade of events resulting in amplification of the initial signal (Sten- nicke et al., 1999). Caspases with a large prodomain, such

as caspases-1, -2, -8 and -9, act as initiator proteases by activating a second group of effector caspases (Kumar 1995; Cohen 1997; Salvesen and Dixit, 1997) that contain short prodomains, such as caspases-3 and -7 (Colussi et al., 1998).

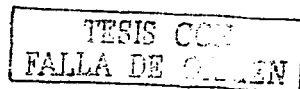
Initiator caspase-9 may be induced by interaction with apoptosis activating factor-1 and cytochrome-c released from the mitochondria (Li et al., 1997; Krajewski et al., 1999). Similarly, adaptor molecules also induce the activation of caspase-8 by promoting self-cleavage (Sten- nicke et al., 1999). The role of the effector caspase-3 in apoptosis has been characterized extensively (Xue et al., 1996; Kumar et al., 1997; Liu et al., 1997; Mukasa et al., 1997; Chandler et al., 1998; Jänicke et al., 1998). This protease is activated by caspase-8 and -9 (Zou et al., 1997; Srinivasula et al., 1998) and is considered a central component of the proteolytic cascade activated during apoptosis (Tewari et al., 1995; Nath et al., 1996; Kothakota et al., 1997; Germain et al., 1999).

Several lines of evidence point to caspase-2 as a key element in apoptotic death (Kumar et al., 1994; Harvey et al., 1997; Li et al., 1997). Caspase-2 has been considered an initiator caspase in non-neuronal preparations (Li et al., 1997; Grossmann et al., 2001; Zhu et al., 2001), a suggestion supported by the fact that this caspase has a long prodomain, which is associated with the adaptor molecule RAIDD. This caspase, however, is activated at the end of the apoptotic process acting preferentially as an executioner caspase (Van de Craen et al., 1999; Johnson et al., 2000; Shearwin-Whyatt et al., 2000; Shimohama et al., 2001). This idea is also supported by the observation that caspase-3 induces the activation of caspase-2 (Butt et al., 1998; Muzio et al., 1998; Swanton et al., 1999).

Contract grant sponsor: CONACyT; Contract grant number: 36235N; Contract grant sponsor: PAPIIT-UNAM; Contract grant number: IN-203400.

*Correspondence to: Julio Morán, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 D.F., México. E-mail: jmoran@ifisciol.unam.mx

Received 26 June 2002; Revised 6 September 2002; Accepted 16 September 2002



Cerebellar granule cells (CGCs) die apoptotically when they are transferred from a depolarizing medium (25 mM KCl; K25) to a normal medium (5 mM KCl; K5). Under these conditions a group of caspases are induced, particularly caspase-3 (Armstrong et al., 1997; Ni et al., 1997; D'Mello et al., 1998; Marks et al., 1998; Morán et al., 1999; Gerhardt et al., 2001), but not others like caspase-1 (Marks et al., 1998; Morán et al., 1999). CGCs also die by other stimuli, such as staurosporine (STS), which is a potent inducer of apoptotic death (Koh et al., 1995; Jacobson et al., 1996; Krohn et al., 1998) and which also activates some proteases, including caspase-3 (Boix et al., 1997; Taylor et al., 1997). Although there is evidence that caspases are involved in the apoptotic cell death of CGCs, the caspase cascade induced by two different apoptotic stimuli in these cells is not known in detail. In this regard, the role of caspase-2 in this preparation has not been elucidated.

We studied the effect of low potassium and STS on the activation of different caspases in cultured CGCs. Using different parameters we found that both K5 and STS induced activation of caspases-3 and -9, as well as the translocation of cytochrome-*c* to the cytosol. In contrast to K5, STS markedly activated caspase-2; thus, two different stimuli induced different caspase activation pathways in the same cell type.

MATERIALS AND METHODS

Fetal calf serum penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO (Grand Island, NY). Poly-L-lysine (mol. wt. >300,000), trypsin, soybean trypsin inhibitor, DNase, staurosporine, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and reagents for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Enhanced chemiluminescence-detecting agent for phosphatase alkaline-conjugated antibodies and molecular weight markers (kaleidoscope) were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA), and polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were from Millipore (Bedford, MA). Antibodies against caspase-1, -2, -3, -8 and -9, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and cytochrome-*c* were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Caspase substrates and inhibitors were from Peptides International (Louisville, KY) and Calbiochem (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of the purest grade available from regular commercial sources.

Cell Cultures

Cerebellar granule cells were obtained as described previously by Morán and Patel (1989a). Briefly, dissociated cell suspensions from the cerebella of 8-day-old rats were plated at a density of 2.65×10^5 cells/cm² in plastic dishes coated previously with poly-L-lysine (5 µg/ml). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin. The culture dishes were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere, and cytosine arabinoside (10 µM) was added after 20 hr. After 7–8 DIV, CGCs were either transferred to a serum-free medium containing 5 mM KCl (referred to in the

text as K5) or treated with STS (0.5 µM) for varying times (3–24 hr). In some experiments, cells were incubated with the indicated concentrations of YVAD-CHO, DEVD-CHO, VIDVAD-CHO, IETD-CHO and LEHD-CHO, preferential inhibitors of caspases-1, -3, -2, -8 and -9, respectively. LIDESD-CHO was also tested as a caspase-2 inhibitor. Inhibitors were added with the different treatments (K5 or STS) and were present until the end of the experiment. Cultures were used for cell viability or caspase activity measurements.

Cell Viability

Cell viability was estimated by MTT assay (Mosmann, 1983) at 12–48 hr after transferring cells to K5 medium. MTT is transformed to formazan blue by active mitochondria, and the absorbance is directly proportional to the number of viable cells. MTT (0.5 mg/ml) was added to the cultures and the cells were incubated 1 hr at 37°C. After removal of medium containing the remaining MTT, 100% dimethyl sulfoxide was added to extract the formazan blue produced. After incubation for 15 min at room temperature in darkness, formazan blue was quantified spectroscopically. The results were calculated as the absorbance at 570 nm minus the absorbance at 630 nm and data were expressed as the percentage of control groups. As shown previously (Baláz et al., 1990; Morán et al., 1999), there was a very good correspondence between the capacity of cultures to form formazan blue and the protein and DNA content, as well as the proportion of neurons that appeared intact by phase-contrast microscopy.

For some experiments, fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) dyes were used to assess cell viability. FDA enters normal cells and emits a green fluorescence when it is cleaved by esterases. Cleaved FDA can no longer permeate cell membranes. Propidium iodide penetrates dying cells and binds to DNA and emits a red fluorescence. Briefly, cells were washed twice, incubated with 5 µg/ml of FDA and 10 µM PI for 10 min at 37°C and then cells were washed with PBS and observed and photographed with a fluorescence microscope equipped with EP illumination using an excitation wavelength of 485 or 450 nm.

Subcellular Fractionation

Mitochondrial and cytosolic fractions were obtained as detailed previously (Krajewski et al., 1999). Cultures were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at 37°C. Homogenization and subsequent stages of subcellular fractionation were carried out in a standard buffer containing 10 mM Tris-HCl, 0.3 mM ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetra-acetic acid (EGTA) and 0.25 M sucrose, pH 7.4, in the presence of 1 µM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin and 5 µg/ml leupeptin. The homogenate was centrifuged at $5,100 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant was centrifuged at $14,500 \times g$ for 30 min at 4°C to yield mitochondrial (pellet) and cytosolic (supernatant) fractions. The mitochondrial pellet was washed and resuspended in standard buffer. In some experiments the pellet was incubated in 1% digitonin for 10 min and mitochondria were recovered by centrifugation at $14,500 \times g$ for 20 min.

TESIS COM
FALLA DE CALIBRE

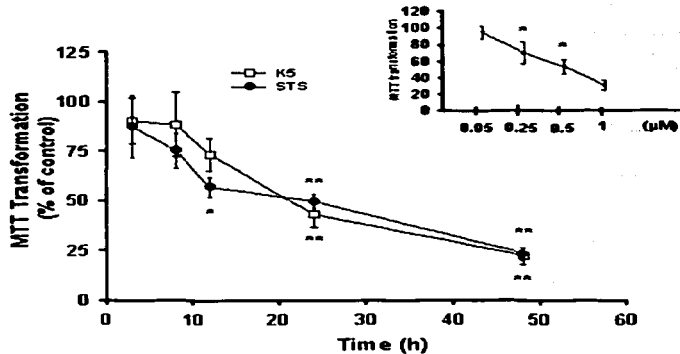


Fig. 1. Effect of K5 and STS on viability of CGCs. Cells were cultured for 7 DIV then transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS. Cell viability was evaluated as MTT transformation (see Materials and Methods) as measured at the indicated times after CGC treatment. Inset shows CGC viability measured as MTT transformation of CGCs 24 hr after application of different concentration of STS. Values are mean \pm SD of 5-7 independent experiments. Significantly different from control (0 hr): * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

Immunoblots

Cells were rinsed twice with PBS at 37°C, homogenized, sonicated in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2% NonidetP-40, 0.2% SDS, 1 μ M PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin and 5 μ g/ml leupeptin, pH 7.4) and centrifuged at $3,400 \times g$ for 20 min at 4°C. The protein concentration of the cell homogenates were determined by the method of Bradford (1976). Homogenates (50 μ g of protein per lane) were run under nonreducing conditions in a one-dimensional SDS-PAGE and electroblotted onto PVDF membranes at 100 V for 1 hr. Blots were blocked with Tris-buffered saline/Tween 20 (TTBS) buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0.1% Tween, pH 7.5) containing 5% nontat dry milk for 3 hr at 4°C, washed three times with TTBS and incubated overnight with the primary antibody. After further washing, the blots were incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody for 1 hr at room temperature. After washing, the blots were processed for visualization using the enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad Laboratories) and exposed to Kodak XAR-5 film. Densitometric analysis of blots was carried out with the Image-J program, NIH Image version 0.93 c.

Caspase Activity Measurement

CGCs were washed with PBS and homogenized in lysis buffer. The homogenates were diluted 1:1 (vol/vol) with glycerol and stored at -70°C. Caspase activities were assayed by a fluorometric method (Thornberry, 1994) in a luminescence spectrometer (Luminescence Spectrometer AMINCO • Bowman Series2) using the tetrapeptides Ac-YVAD-AMC, Ac-VDVAD-AMC, Ac-DEVD-AMC, IETD-AMC and LEHD-AMC as substrates to detect the activity of caspase-1, -2, -3, -8 and -9, respectively. Caspase-2 activity was also measured using Ac-LEDES-AMC. The reactions were followed for 15 min

after addition of substrate (25 μ M) and cell homogenate (30 mg/ml) in a standard solution containing 100 mM HEPES, 10% (wt/vol) sucrose, 0.1% (wt/vol) 3-[[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 10 mM di-thiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, and 5 μ g/ml leupeptin.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SD values, and statistical significance of the results was determined by Student's *t*-test.

RESULTS

Effect of K5 and Staurosporine on Cell Death of CGCs

In a previous study it was observed that CGCs grown for 7 DIV in a K25 medium and transferred to a low K medium die in a concentration-dependent manner (D'Mello et al., 1998; Morán et al., 1999). We confirmed those results, evaluating cell viability as MTT transformation of CGCs treated with K5. Under these conditions we found a reduction of cell viability of about 55% and 73% after 24 hr and 48 hr, respectively, when compared to control (Fig. 1). These results were similar to those obtained using FDA-PI to label living cells ($49.8 \pm 4.1\%$ after 24 hr and $28.3 \pm 3.9\%$ after 48 hr). Similarly, STS used at a concentration of 0.5 μ M induced a decrease of cell viability of 50% and 80% after 24 hr and 48 hr, similar to what was observed for K5 (Fig. 1). CGC death induced by STS is also concentration-dependent (Fig. 1, insert). When cells grown in a K25 medium for 7 DIV were treated with 0.25 μ M, 0.5 μ M, or 1 μ M STS for 24 hr, cell survival was reduced by 30%, 50% and 70%, respectively (Fig. 1, insert).

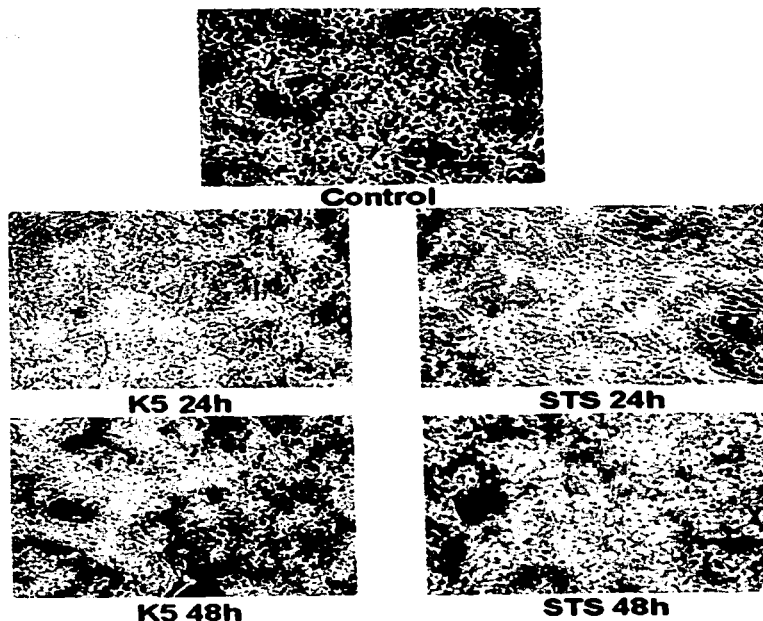


Fig. 2. Effect of K5 and STS on the morphology of CGCs. Cells were cultured for 7 DIV in K25 (Control) and cultures were transferred to K5 or treated with STS ($0.5 \mu\text{M}$). Cultures were observed under phase contrast microscopy after 24 or 48 hr. Scale bar = $50 \mu\text{m}$.

These results were supported by the change in the morphological appearance of CGCs transferred to K5 medium or treated with STS and observed by phase contrast microscopy (Fig. 2). Both, K5 and STS ($0.5 \mu\text{M}$) treatments induced similar morphological alterations of CGCs. After 24 hr most cells exhibited a decrease in cell volume and an appreciable degeneration of their soma and neuritic processes, particularly in the presence of STS. After 48 hr most cells are already dead in both conditions (Fig. 2).

Caspase Activation by Staurosporine and K5

Caspase-3. The activity of caspases-1, -2, -3, -8, and -9 was evaluated using fluorogenic substrates. It has been demonstrated that these substrates show specificity for the different caspases (Thornberry et al., 1997) and this was further confirmed in this study with the observed

fragmentation of these caspases together with the action of caspase inhibitors. The activity of caspase-3 was measured as Ac-DEVID-AMC cleavage at different times after treatment. As it has been shown previously (Shultz et al., 1996; Atlante et al., 1998; Morán et al., 1999), DEVID-AMC cleavage was markedly increased in cells transferred to a K5 medium (Fig. 3A). DEVID cleavage reached a maximum after 8–12 hr and then showed a marked decrease (Fig. 3A). The activity of caspase-3 was inhibited by approximately 36% and 48% when cells were incubated during 8 hr with K5 in the presence of caspase-2 and -9 inhibitors ($10 \mu\text{M}$), respectively (not shown). When cells were treated with $0.5 \mu\text{M}$ STS, Ac-DEVID-AMC cleavage showed a time course similar to that observed for K5, although the activation was markedly lower (about three times). The time course of caspase activity and procaspase fragmentation observed by immunoblot assays occasion-

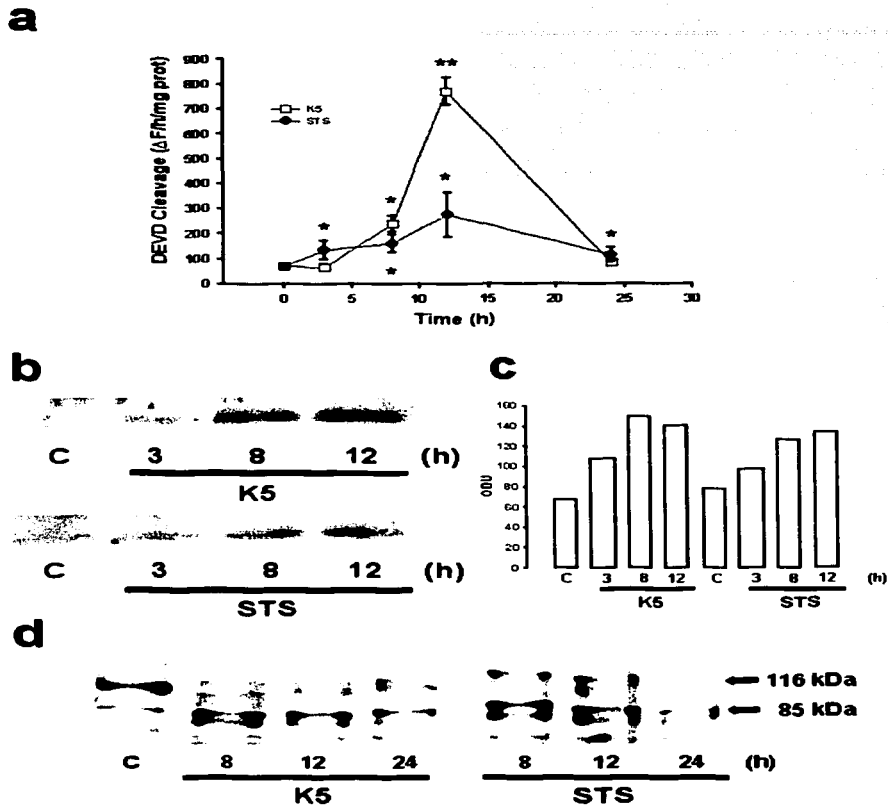


Fig. 3. Effect of STS and K5 on DEVD cleavage and caspase-3 and PARP processing in CGCs. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS for the indicated periods of time. **A:** Time course of cleavage of Ac-DEVD-AMC. Results are expressed as the change in fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean \pm SD of five independent experiments. Significantly different from control (0 hr): * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$. **B:** Time course of caspase-3 fragmentation by K5 or 0.5

μ M STS, analyzed by Western blot assay. The 17-kDa band shown is a product of proteolysis of the caspase-3 proenzyme after 3, 8, and 12 hr of treatment. **C:** Densitometric analysis of the 17-kDa band of representative immunoblot from five separate experiments. Analysis was carried out as detailed in Materials and Methods. **D:** Time course of PARP fragmentation induced by STS and K5 in CGCs revealed by immunoblot assay. Arrows indicate intact (116 kDa) and 85-kDa fragment of PARP after 8, 12, and 24 hr of treatment.

TESIS CON
FALLA DE CUBREN

ally showed an apparent lack of correlation that could be explained by a loss of the proteolytic activity of the fragment but the preservation of the fragments immunoreactivity. In the presence of 10 μ M caspase-2 inhibitor during STS incubation the activity of caspase-3 was reduced by almost 66% (not shown).

As DEVD can be cleaved by caspases-3 and -7 (Thornberry et al., 1997), we used Western blot analysis to evaluate the generation of the active fragments of caspase-3 and caspase-7 in homogenates from cells treated with K5 or STS. Under these conditions, caspase-7 was not processed after 3–24 hr of treatment (not shown). In contrast, immunoblot assays revealed the presence of 17-kDa fragments derived from caspase-3 proenzyme in CCGs treated with both K5 and STS (Fig. 3B). The time course of the caspase-3 processing was similar to that observed for the caspase activity, i.e., the higher density of the fragments corresponded to 8–12 hr of treatment as evidenced by the densitometric measurements (Fig. 3C). These results, together with the suggestion that caspase-7 is not present in the brain, may indicate that caspase-3 is responsible for Ac-DEVD-AMC cleavage in our preparation.

To further confirm the activation of caspase-3, we determined the proteolytic cleavage of PARP, a natural substrate of caspase-3, by detecting the characteristic 85-kDa fragment via Western blot (Fig. 3D). The PARP processing in homogenates from CCGs treated with K5 was similar to that observed in other studies (Eldadah et al., 1997; Taylor et al., 1997). Under both conditions there was a time-dependent decrease of the PARP levels (116-kDa band) concomitant with an increase in the density of the 85-kDa band, corresponding to one of the products of PARP proteolysis by caspase-3 (Fig. 3D). The higher levels of the 85-kDa fragments were observed between 8–12 hr.

Caspase-8. It has been shown that caspase-3 activation is induced by the initiators caspases-8 and -9 by different stimuli (Srinivasula et al., 1996; Muzio et al., 1998; Thornberry et al., 1997; Stennicke and Salvesson, 1998). We have evaluated the activity of caspase-8 using the Ac-IETD-AMC peptide as a preferred substrate (Thornberry et al., 1997). Interestingly, we observed the presence of a small but significant caspase-8-like activity under control conditions (Fig. 4A). When cultures were treated for 3 hr with either K5 or 0.5 μ M STS, we found a reduction followed by an increase of the basal activity of caspase-8 (Fig. 4A). After 24 hr the activity in K5 and STS conditions almost disappeared (Fig. 4A). In line with the observed activity, when we analyzed the processing of caspase-8 by Western blot assay we detected the p20 fragment in homogenates of control cells and from cells treated with both STS and K5 (Fig. 4B), as evidenced by the densitometric measurements (Fig. 4C).

Caspase-9. Ac-LEHD-AMC cleavage was used to evaluate the activity of caspase-9. We found that STS produced a marked effect on caspase-9 activation, showing a three-fold increase of LEHD cleavage after 8 hr of the

treatment (Fig. 5A). K5 treatment also induced a smaller but significant activation of caspase-9 (Fig. 5A). In a previous study we reported a lack of caspase-9 activity induced by K5 (Valencia and Morán, 2001) evaluated as substrate cleavage. This lack of activity could have been due to technical problems, including the integrity of this substrate, which could have lead to an inaccurate estimate of protease activity. In the present study we included additional experimental approaches to evaluate the participation of this caspase; by immunoblot assay, we confirmed the activation of caspase-9 by K5 by showing the presence of the 10-kDa fragments induced by this condition (Fig. 5B). On the other hand, in STS homogenates the p10 band was prominently displayed (Fig. 5B). In both cases the p10 fragments were evident after 8 hr and they were present after 24 hr (Fig. 5B). These results are shown in the densitometric measurements (Fig. 5C).

Caspase-1. We measured the activity of caspase-1 as Ac-YVAD-AMC cleavage and found that caspase-1 was not activated by K5, in agreement with previous studies (Morán et al., 1999). Similarly, STS did not affect caspase-1 activity at any time measured (i.e., 5 min to 24 hr, not shown). These results were supported by the Western blot assay for caspase-1, in which we could not detect any fragment from homogenates of K5 or STS-treated cultures for short (5 min to 3 hr, not shown) or long periods of time (4–24 hr).

Caspase-2. We measured the activity of caspase-2 as Ac-VDVAD-AMC cleavage and found that STS induced the processing of fluorogenic synthetic peptide Ac-VDVAD-AMC 3 hr after the application of treatment (Fig. 6A). Under these conditions, the activity of caspase-2 reached the highest levels after 8 hr (Fig. 6A). K5 also induced the cleavage of VDVAD-AMC; however, the observed increase was small and it showed a maximum after 12 hr (Fig. 6A). To confirm these results, we measured cleavage of a different caspase-2 substrate, Ac-LDESID-AMC (Swanton et al., 1999). We again found that K5 induced only a slight processing of Ac-LDESID-AMC after 8–12 hr, as compared to STS, which induced a 12- and 5-fold increase of the substrate cleavage after 8 and 12 hr of treatment, respectively (not shown). To further evaluate the activation of caspase-2 with both stimuli, an immunoblot assay was used to examine the processing of the proenzyme. Figure 6B shows an 18-kDa band corresponding to the active fragment of caspase-2 in homogenates from cells treated with STS for different lengths of time. This fragment was observed between 3 and 12 hr (Fig. 6B). In contrast, K5 was not able to induce caspase-2 fragmentation during the first 24 hr (Fig. 6B). These results are shown in the densitometric measurement (Fig. 6C) and suggest that the cleavage of Ac-VDVAD-AMC observed in K5 could be due to the action of caspase(s) other than caspase-2.

Cytochrome-c Release

One of the proposed mechanisms by which caspase-9 is activated is through the release of cytochrome-c from mitochondria to cytosol. Figure 7 shows cytochrome-c

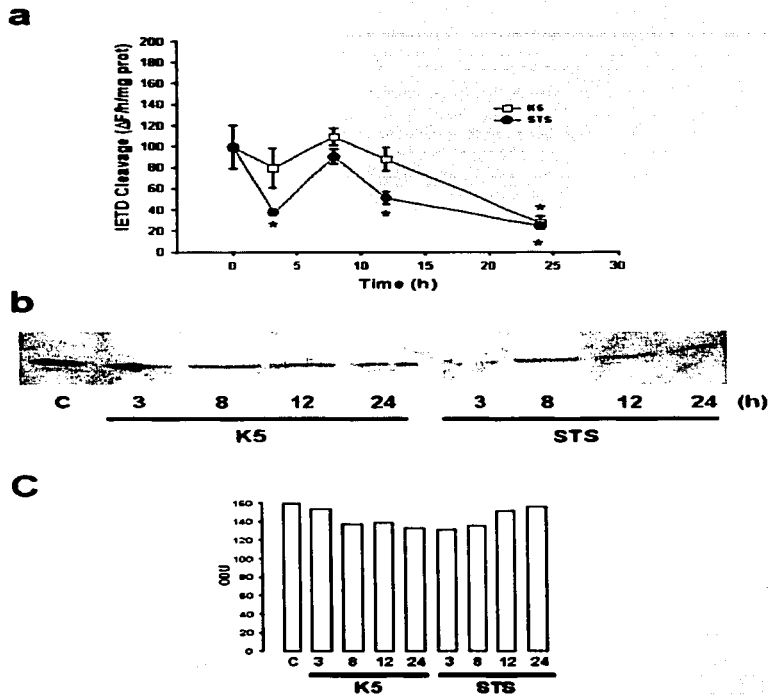


Fig. 4. Effect of STS and K5 on IETD cleavage and caspase-8 fragmentation in CGCs. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS during the periods of time indicated. **A:** Time course of Ac-IETD-AMC. Results are expressed as the change in fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean \pm SD of seven independent experiments. Significantly different from control (0 hr): * $P < 0.01$. **B:** Time course of caspase-8 fragmentation by K5 or 0.5 μ M STS, analyzed by Western blot assay. Bands correspond to the 20-kDa fragment of caspase-8 proenzyme. **C:** Densitometric analysis of the 20-kDa band from representative immunoblots of three separate experiments. Analysis was carried out as detailed in Materials and Methods.

detected as a 17-kDa band in the mitochondrial and cytosolic fractions of CGC homogenates. In CGCs treated with K5, a decrease in mitochondrial cytochrome-c was observed, reaching a maximal reduction after 8 hr (Fig. 7A), which corresponds to the increase observed in the cytosolic cytochrome-c levels (Fig. 7B). STS treatment also induced a marked reduction in cytochrome-c levels in the mitochondrial fraction 6 hr after treatment (Fig. 7A). These changes in levels of mitochondrial cytochrome-c also correlated with an increase observed in the levels of the 17-kDa band in the cytosolic fraction of these cells, as compared to controls after 8 hr (Fig. 7B). When the mitochondrial fraction was treated with digitonin, the

cytochrome-c content was reduced markedly (Fig. 7A), showing that the mitochondrial fraction was preserved during fractionation and that the content of cytochrome-c remained intact.

Effect of Caspase Inhibitors

To evaluate the role of different caspases on CGC death induced by K5 and STS, we studied the effect on cell survival of the caspase inhibitors DEVD-CHO, IETD-CHO, and LEHD-CHO, which show relative specificity for caspases-3, -8, and -9, respectively. Caspase-2 was inhibited preferentially by two different peptides, VIDVAD-CHO and LDESID-CHO. The caspase

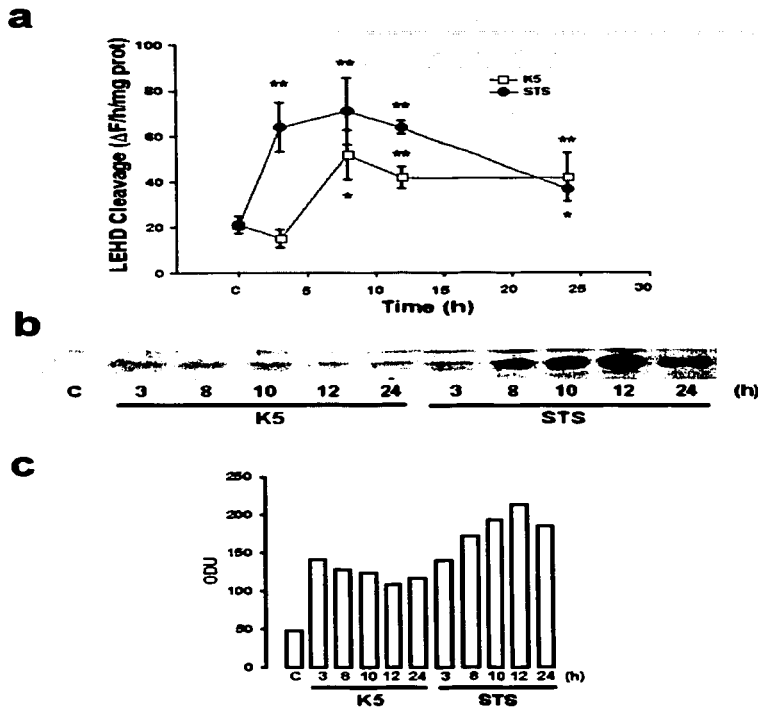


Fig. 5. Effect of STS and K5 on LEHD cleavage and caspase-9 fragmentation in CGCs. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS for the indicated periods of time. **A:** Time course of caspase-9 activity measured as the cleavage of Ac-LEHD-AMC. Results are expressed as the change in fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean \pm SD of five independent experiments. Significantly different from control (0 hr): * P < 0.01, ** P < 0.001. **B:** Time course of caspase-9 fragmentation by K5 or 0.5 μ M STS analyzed by Western blot assay. Bands correspond to the 10-kDa fragment of the caspase-9 procaspase. **C:** Densitometric analysis of the 10-kDa band from representative immunoblot of three separate experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods.

inhibitors were used at a concentration of 10 μ M; higher concentrations were ineffective or induced cell death. Inhibitor specificity was tested in homogenates from cells with different activated caspases. All caspase activities were abolished completely when their corresponding inhibitors were added to the cell homogenates during fluorometric measurement (not shown). On the other hand, using this protocol, the caspase-8 and -9 inhibitors were unable to modify the activity of caspase-2 and -3, caspase-3 inhibitor did not reduce caspase-2 activity, and caspase-2 inhibitor did not affect the activity of caspase-9. Thus, the peptide inhibitors seem to be specific for their corresponding

caspases. When cells were incubated simultaneously with caspase inhibitors and K5, we found that CGC death was reduced slightly by caspase-3 blockers, whereas the caspase-9 inhibitor significantly protected CGCs from cell death after 24 hr of treatment (Fig. 8A). Under these conditions, the caspase-8 inhibitor IETD-CHO had a small effect on the K5-induced CGC death (Fig. 8A). VIDVAD-CHO and LDESID-CHO, specific inhibitors of caspase-2, were not able to block cell death induced by K5. On the other hand, when CGCs were treated with STS, caspase-2 inhibitors reduced CGC death by about 70–80% as compared to control cells (K25); caspases-3, -8

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

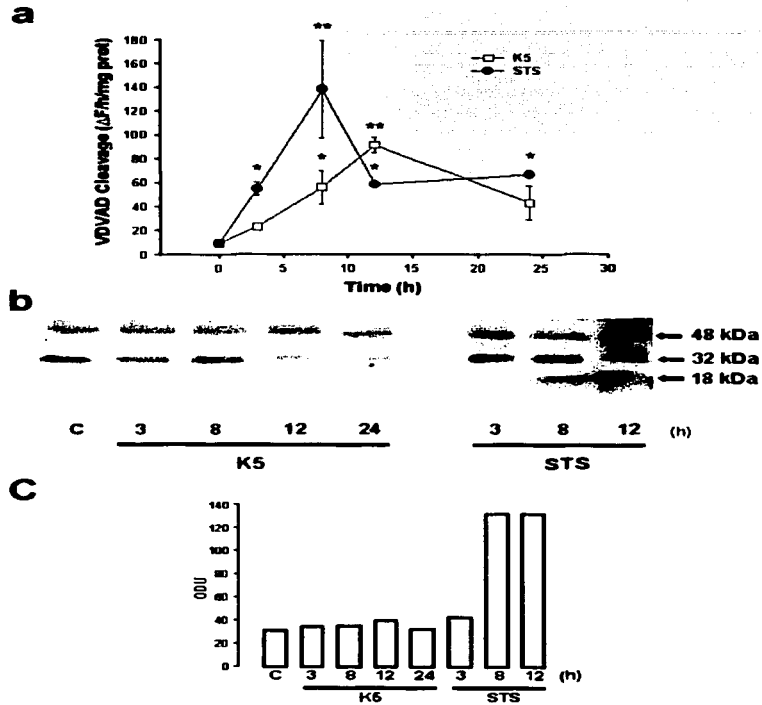


Fig. 6. Effect of STS and K5 on the VDVAID cleavage and caspase-2 fragmentation in CGCs. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS for the indicated periods of time. **A:** Time course of the cleavage of Ac-VDVAID-AMC. Results are expressed as the change in fluorescence per hour per milligram of protein. Values are mean \pm SD of five independent experiments. Significantly different from control (0 hr): * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$. **B:** Time course of caspase-2 fragmentation by K5 or 0.5 μ M STS, analyzed by Western blot assay. Arrows show the proenzyme of caspase-2 (48 kDa) and the cleavage products of proenzyme caspase-2 (32 and 18 kDa) after 3, 8 and 12 hr. **C:** Densitometric analysis of the 18-kDa band from representative immunoblot of four separate experiments. Analysis was done as detailed in Materials and Methods.

and -9 inhibitors partially reduced CGC death when used at a concentration of 10 μ M (Fig. 8B).

These results were supported by the morphological appearance of CGCs treated with K5 or STS for 24 hr in the presence of caspase inhibitors. Figure 9A shows that when treated with K5, only those CGC cultures treated with inhibitors of caspases-3 and -9 were partially or completely protected from death. In contrast, the caspase-8 inhibitor IETD-CHO did not show a significant effect on the morphology of CGCs (Fig. 9A) as compared to the K5 or K25 conditions. In addition, the caspase-2 inhibitors VDVAID-CHO and LDES-CHO did not prevent the

K5-induced damage. When caspase-3 inhibitor was incubated with caspase-2 or -8, we did not observe any difference compared to caspase-3 alone (Fig. 9A); however, the combination of caspase-3 and -9 inhibitors markedly reduced the CGC death induced by K5 (not shown). When cultures treated with STS for 24 hr were incubated with caspase-8 inhibitor, no protective effect was observed, although caspase-3 and -9 inhibitors partially protected CGCs from cell death. In contrast, the caspase-2 inhibitor showed a marked protective effect against STS-induced death (Fig. 9B). The combination of inhibitors of caspase-3 and caspase-2 or -9 completely abolished CGC

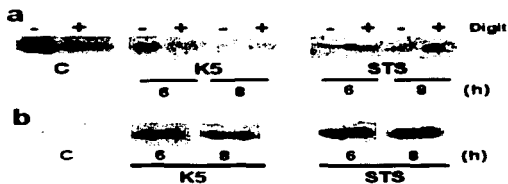


Fig. 7. Effect of K5 and St on the cytochrome-c release form mitochondria in CGCs. Cells maintained in K25 (C) for 7 DIV were transferred to K5 or treated with 0.5 μ M STS for the indicated periods of time. Cells were fractionated to yield mitochondrial and cytosolic fractions as described in Materials and Methods. Representative immunoblots of cytochrome-c in the mitochondrial (A) and cytosolic (B) fractions of CGCs are shown. In A, cells were treated with digitonin (Digit; 1%) before cell fractionation.

death induced by STS. Again, the presence of caspase-3 and -8 inhibitors did not modify alteration of CGC morphology by STS (not shown).

DISCUSSION

Apoptosis is a process of cell death involved in the homeostasis of organisms. The study and characterization of molecules that have a key role in this process has allowed the elucidation of part of the mechanisms responsible for the apoptotic cell death. Caspases seem to be one of the main components of apoptotic machinery (Chen et al., 1998; Ni et al., 1998). The process seems to be carried out through a protease cascade. A group of caspases acts as initiators in the cascade, directly or indirectly activating a second group of proteases, the effector caspases (Kumar, 1995; Cohen, 1997; Salvesen and Dixit, 1997) that mediate the cleavage of a large number of proteins (Nicholson and Thornberry, 1997; Porter et al., 1997).

In this study, we used two different stimuli, deprivation of KCl (K5) and STS, to induce the apoptotic cell death of cerebellar granule cells and we found that both induced the activation of different caspases. An observation from the present study was that some caspases were not activated by the stimuli used, as it was for caspase-1, which did not show any activation in CGCs treated with K5, as observed in previous studies (Marks et al., 1998; Morán et al., 1999). In addition, we found that STS was unable to activate caspase-1 in this preparation. In a previous study using hippocampal neurons treated with STS, caspase-1 was shown to be activated a short time after STS exposure (i.e., 30 min), suggesting that this protease could be an initiator caspase (Krohn et al., 1998). Caspase-1 activity could not be detected in CGCs treated with STS or K5, however, even at times as short as 5 min. Thus, it is possible that the same signal for apoptotic death could induce different caspase cascades depending on the type of neuron.

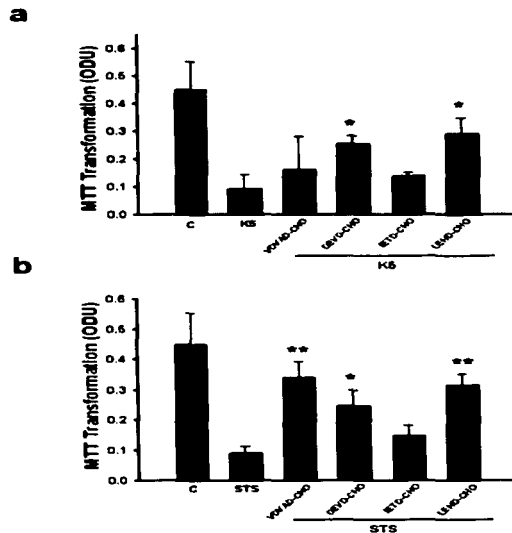


Fig. 8. Effect of caspase inhibitors on the CGC death induced by STS and K5. Cells were cultured for 7 DIV, then treated with 0.5 μ M STS (A) or transferred to K5 (B). Caspase inhibitors were present at a concentration of 10 μ M from the beginning of treatment. Cell viability was measured as MTT transformation after 24 hr (see Materials and Methods). Results are expressed as optical density units (ODU). Bars are mean \pm SD of three independent experiments. Significantly different from STS (A) or K5 (B), * P < 0.01, ** P < 0.001.

Caspase-3 has been shown to act as an effector caspase during apoptosis in a large variety of preparations (Xue et al., 1996; Chandler et al., 1998; Jänicke et al., 1998; Marks et al., 1998). As demonstrated in previous studies (Armstrong et al., 1997; Ni et al., 1997; D'Mello et al., 1998; Marks et al., 1998; Morán et al., 1999), our results demonstrated that K5 activated caspase-3 in CGCs. Similarly, STS activated caspase-3 with a comparable temporal course, being evident at 4–6 hr and reaching a maximum at about 8–12 hr after CGC treatment. The cleavage of PARP, an endogenous substrate of caspase-3, confirms the activation of this caspase by both K5 and STS in CGCs. The involvement of this caspase in the apoptotic death of CGCs by K5 and STS was further supported by the effect of the caspase-3 inhibitor on apoptotic death;

Caspase Activation in Granule Neurons

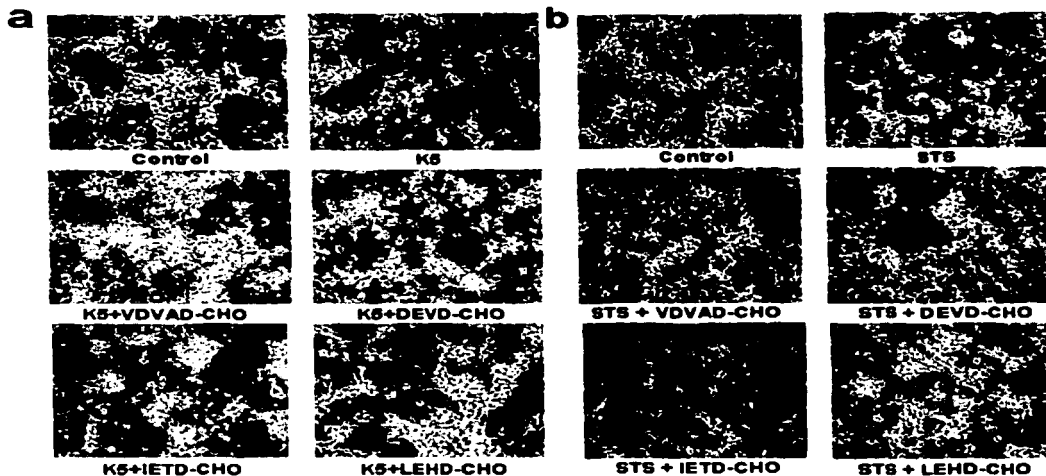


Fig. 9. Effect of caspase inhibitors on the morphology of CGCs induced by K5 or STS. Cells were cultured for 7 DIV in K25 and transferred to K5 or treated with STS (0.5 μ M) in the presence or absence of caspase inhibitors (10 μ M). After 24 hr cells were observed

under phase contrast microscopy. **A:** CGCs maintained in K25 (control) or transferred to K5 plus the caspase inhibitors indicated. **B:** CGCs maintained in K25 (control) or treated with STS plus the indicated caspase inhibitors. Scale bar = 75 μ m.

however, this condition only partially protected CGCs from death, which suggests that another effector caspase, in addition to caspase-3, could be activated by K5 or STS.

The caspase cascade can be initiated by the activation of caspase-8 or -9. Caspase-8 can activate all known caspases *in vitro*, including itself (Srinivasula et al., 1996). It has been hypothesized that self-processing of caspases may be determined by their proximity to other caspases of the same type, which is controlled by adapter molecules (Srinivasula et al., 1998; Yang et al., 1998). Some studies have hypothesized that initiator caspases-8 and -9 share this proximity mechanism of activation (Srinivasula et al., 1998; Yang et al., 1998). The zymogen of caspase-8 possesses ~1% of the active fragment, and it is hypothesized that this small activity is enough to process the clustered caspase-8 zymogen and induce the active form of this protease (Stennicke et al., 1999). We found that under control conditions, both the caspase-8 fragment revealed by Western blot and caspase-8 activity are markedly high, suggesting a basal activity of this caspase in control cells. Despite the observed caspase-8 activity, however, these cells did not show any sign of cell death even after long

periods in culture. We therefore suggest that a mechanism of control for the action of this caspase such as an endogenous inhibitor of apoptosis molecules should be operating (Devereaux et al., 1997, 1998; Koseki et al., 1998). The physiological meaning of increased caspase-8 activity under normal conditions is not clear. It could be speculated, however, that this caspase might be involved not only as a positive effector of cell death, but also in the processing of molecules necessary for cell differentiation or survival. Further experimental data are needed to confirm those possibilities.

In the present work the activity of caspase-8 undergoes a small increase after a transient reduction induced by both K5 and STS. This mild response of caspase-8 was further confirmed by immunoblot analysis. In the case of the viability studies using caspase-8 inhibitor, the results showed only a partial rescue action of this inhibitor on CGC death induced by K5 and, to a lesser extent, by STS. Recent evidence suggests that apoptotic death of CGCs induced by K5 is regulated by the activation of caspases-9, -8 and -3. It has been proposed that caspase-9 is the apical caspase and responsible for activation of caspases-3 and -8

TESIS COM
FALLA DE CALIFICACION

(Gerhardt et al., 2001). These findings support part of the results obtained in the present study. We suggest that caspase-8 could be marginally involved in the caspase cascade induced by K5. The role of this caspase in the process induced by STS seems to be less important.

Caspase-9 may be induced directly by its interaction with apoptosis activating factor-1 (Apaf-1) together with ATP and cytochrome-c released from mitochondria (Li et al., 1997; Krajewski et al., 1999). This would, in turn, activate the effector caspases (Kluck et al., 1997; Harvey and Kumar, 1998). We found that K5 and STS were able to induce the release of cytochrome-c in a time-dependent manner. The observed release of cytochrome-c was in agreement with the detected activation of caspase-9 and with the processing of its proenzyme induced both by K5 and STS. Again, the caspase-9 inhibitor markedly reduced the CGC death induced by K5 and, to a lesser extent, by STS. Taken together, these results support a central role of caspase-9 in cell death induced by these stimuli.

An interesting result from our study was the activation of caspase-2 by STS in CGCs. This was evidenced not only by the cleavage of the synthetic peptide, but also by the fragmentation of the proenzyme and the remarkable protective effect of the inhibitor on the viability and morphology of STS-treated CGCs. This was further confirmed by the marked inhibition of caspase-3 activity induced by the addition of caspase-2 inhibitor to STS-treated CGCs. Thus, caspase-2 seems to have a key role in the CGC apoptotic death induced by STS but not by low potassium. This caspase has an important role in the apoptotic cell death of different cell types and is active at the end of the caspase cascade (Colussi et al., 1998; Swanton et al., 1999; Van de Craen et al., 1999), suggesting that caspase-2 can act as an effector caspase in neuronal cells. On the other hand, some evidence indicates that caspase-2 is activated early in the apoptotic process and seems to precede the caspase-3 activation. According to the potent effect of inhibitors on the parameters measured, as well as the time course of caspase-2 activation by STS, it could be proposed that this caspase acts early in the caspase cascade in the neuronal type used in this study. This is in line with the suggestion that caspase-2 could be considered an initiator/effector caspase in other preparations (Li et al., 1997) showing that the activation of this caspase precedes the activation of caspase-3 (Harvey et al., 1997). These suggestions are also supported by recent evidence obtained in other preparations (Grossmann et al., 2001; Zhu et al., 2001). In neuronal cells, however, caspase-2 has been proposed to be either an effector caspase (Van de Craen et al., 1999; Johnson et al., 2000; Shearvin-Whyatt et al., 2000; Shimohama et al., 2001) or an initiator caspase (Troy et al., 2000), as proposed in our preparation. It is possible that the observed differences could be due to the nature of the apoptotic signal used, possibility supported by the present study. Finally, in the case of K5 stimulation, caspase-2 seems to participate only marginally in the apoptotic process; thus, in contrast to the STS stimulation,

we suggest that this caspase does not have a central role in the mechanisms of CGC apoptotic death.

Based on these results, we propose that apoptotic death of CGCs by K5 seems to be mediated by the release of cytochrome-c and the activation of caspase-9, which in turn would induce the activation of both caspases-8 and -3. On the other hand, staurosporine seems to activate caspase-2, which could have an initiator role in the caspase cascade by activating caspase-9 (probably induced by release of cytochrome-c from mitochondria) as well as caspase-3. Thus, two different stimuli may induce different caspase cascades in the same cell.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Ms. G. Domínguez. This research was supported by grants 36235-N from CONACYT and IN-203400 from DGAPA-UNAM. A.C. was supported by CONACYT and DGEPI-UNAM fellowship.

REFERENCES

- Armstrong KC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. 1997. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci* 17:553-562.
- Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calistano P. 1998. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett* 245: 127-130.
- Balzis K, Hoek N, Jorgensen OS. 1990. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 37:251-258.
- Boix J, Llecha N, Yuste VJ, Comella JX. 1997. Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacol* 36:811-821.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Butt JA, Harvey LN, Parasivan G, Kumar S. 1998. Dimerization and auto processing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem* 273:6763-6768.
- Chandler MJ, Cohen MG, MacFarlane M. 1998. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* 273:10815-10818.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler KA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. 1998. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914-4928.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *J Biochem* 326:1-16.
- Colussi AP, Harvey LN, Kumar S. 1998. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. *J Biol Chem* 273:24535-24542.
- Devereaux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17:2215-2223.
- Devereaux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304.
- D'Mello SR, Aglicco F, Roberts MR, Borodetz K, Haycock JW. 1998. A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K deprivation. *J Neurochem* 70:1809-1818.

26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Caspase Activation in Granule Neurons

- Eldadah AB, Yakovlev GA, Faden IA. 1997. The role of CED-3-related cysteine proteases in apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 17:6105-6113.
- Fauchen CA, Dittu AW, Chan AM, Blanchet C, Miossec F, Herve V, Collard-Dutilleul Y, Gu RA, Aldape JA, Lippke C, Rocher MSS, Su DJ, Livingston T, Herendy Lalanne JL. 1995. A novel human protease similar to the interleukin-1 β -converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J* 14:1914-1922.
- Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Vollbracht C, Weller M, Bähr M, Nicotera P, Schulz JB. 2001. Cascade of caspase activation in potassium-deprived cerebellar granule neurons: targets for treatment with peptide and protein inhibitors of apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 17:717-731.
- Germain M, Aiffr B, D'Amours D, Dixit VM, Salvensen GS, Poirier GG. 1999. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. *J Biol Chem* 274:28379-28384.
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiesling S, Schölmerich J. 2001. Apoptosis signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 12:147-155.
- Harvey N, Butt JA, Kumar S. 1997. Functional activation of Need-2/ICE-1 (caspase-2) in an early process in apoptosis. *J Biol Chem* 272:13134.
- Harvey NL, Kumar S. 1998. The role of caspases in apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 62:107-128.
- Jacobson BA, Rothstein TL, Marshak-Rothstein A. 1996. The role of Fas/FasL interactions in the regulation of B cell function. *Behring Inst Mitt* 97:185-199.
- Janicke UR, Sprengart LM, Wati RM, Porter GA. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273:9357-9360.
- Johnson VL, Ko SC, Holmstrom TH, Eriksson JE, Chow SC. 2000. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological during chemical-induced apoptosis. *J Cell Sci* 113:2941-2953.
- Klack RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. 1997. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* 140:1485-1495.
- Koh JY, Wie MB, Gwang BJ, Sensi SL, Canzonero LM, Demaro J, Czernianny C, Choi DW. 1995. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol* 135:153-159.
- Kovick T, Inohara N, Chen S, Núñez G. 1998. ACR, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5156-5160.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelatinin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.
- Krajewski S, Krajewski M, Elserby MI, Welsh K, Xie Z, Devereaux QL, Salvesen GS, Brédresen ED, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5752-5757.
- Krohn JA, Preis E, Prehn MJ. 1998. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci* 18:8186-8197.
- Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. 1994. Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* all death gene *ced-3* and the mammalian II-beta-converting enzyme. *Genes Dev* 8:1613-1626.
- Kumar S. 1995. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20:198-202.
- Kumar S, Kinoshita M, Noda M. 1997. Characterization of a mammalian cell death gene *Nedd2*. *Leukemia Suppl* 3:385-386.
- Li H, Bergeron L, Cryns V, Pasternack SM, Zhu H, Shi L, Greenberg AY, Yuan J. 1997. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem* 272:21010-21017.
- Lui X, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Marks N, Berg JM, Cuidorri A, Saito M. 1998. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 52:334-341.
- Morán J, Patel A. 1989a. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res Dev Brain Res* 46:97-105.
- Morán J, Itoh T, Reddy RU, Chen M, Alnemri SE, Pleasure D. 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J Neurochem* 73:568-577.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mukasa T, Urase K, Momoi YM, Kimura I, Momoi T. 1997. Specific expression of CPP32 in sensory neurons of mouse embryos and activation of CPP32 in apoptosis induced by a withdrawal of NGF. *Biochem Biophys Res Commun* 231:770-774.
- Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano EJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamini TT, Yu VL, Nicholson DW. 1995. Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICE β and ICE γ , members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270:15870-15876.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit MV. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-2930.
- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talianian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KKW. 1996. Non-erythroid α -spectrin breakdown by calpain and interleukin-1 β converting enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory role of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 319:683-690.
- Ni B, Wu X, Du Y, Su Y, Hamilton-Byrd E, Roceky PK, Roestek P Jr, Poirier GG, Paul SM. 1997. Cloning and expression of a rat brain interleukin-1 β converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role of apoptosis of cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 17:1561-1569.
- Ni B, Wu X, Su Y, Stephenson D, Smailzig EB, Clemens EJ, Paul SM. 1998. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:248-256.
- Nicholson DW, Thornberry N. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.
- Porter AG, Ng P, Janicke RU. 1997. Death substrate comes alive. *Bioassays* 19:501-507.
- Salvesen SG, Dixit MV. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- Schulz JB, Weller M, Klockgether T. 1996. Potassium deprivation-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species. *J Neurosci* 16:4696-4706.
- Shearwin-Whyatt LM, Harvey NL, Kumar S. 2000. Subcellular localization and CARD-dependent oligomerization of the death adaptor RAIDD. *Cell Death Differ* 7:155-165.
- Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S. 2001. Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1063-1066.

- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandez-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitible protease that activates multiples ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14486-14491.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1:949-957.
- Stennicke HR, Devereaux GL, Humke WE, Reed CJ, Dixit MV. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274:8359-8362.
- Stennicke HR, Salvesen GS. 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1387:17-31.
- Swanton E, Savory P, Cosulich S, Clarke P, Woodman P. 1999. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene* 18:1781-1787.
- Taylor J, Catchalan LC, Keen G, Rubin LL. 1997. Apoptosis in cerebellar granule neurons: involvement of interleukin-1 β converting enzyme-like proteases. *J Neurochem* 68:1598-1605.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32, a mammalian homologue of CED-3, is a CrmA-inhibitible protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
- Thornberry NA. 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Meth Enzymol* 244:615-631.
- Thornberry N, Bull H, Calaycay J, Chapman R, Howard A, Kostura M, Miller D, Molineaux S, Weidner J, Aunins J. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
- Thornberry N, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem* 272:17907-17911.
- Troy MC, Rabacchi AS, Friedman JW, Frappier FT, Brown K, Shelanski LM. 2000. Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amyloid. *J Neurosci* 20:1386-1392.
- Valencia A, Morán J. 2001. Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 64:284-297.
- Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenaebelle P. 1999. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* 6:1117-1124.
- Xue D, Shaham S, Horvitz R.H. 1996. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 10:1073-1083.
- Yang X, Stennicke HR, Wang B, Green DR, Janicke KU, Srinivasan A, Seth P, Salvesen GS, Fralich CJ. 1998. Granzyme B mimics apical caspases. Description of initiate pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 273:34278-34283.
- Zhu J, Nozell S, Wang J, Jiang J, Zhou W, Chen X. 2001. p73 cooperates with DNA damage agents to induce apoptosis in MCF7 cells in a p73 dependent manner. *Oncogene* 20:4050-4057.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschig A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

MECANISMOS MOLECULARES DE LA REGULACIÓN DE LA MUERTE APOPTÓTICA

Andrea Caballero Benítez y Julio Morán Andrade. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular. UNAM. Apdo. Postal 70-253, P.C. 04510, México D.F. Tel: 56 22 56 16. Fax: 56 22 56 07. Correo electrónico: abenitez@ifisiol.unam.mx, jmoran@ifisiol.unam.mx

Título breve: Moléculas reguladoras de muerte apoptótica.

RESUMEN

La muerte apoptótica es un evento natural que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y es parte de un proceso de eliminación de células en organismos maduros, presentándose también en diversas patologías como en el caso de enfermedades neurodegenerativas. Las células apoptóticas presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan de una serie de eventos controlados genéticamente. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado más de 10 genes que regulan la muerte apoptótica observada durante el desarrollo de este organismo. Para 3 de estos genes se han identificado homólogos en mamíferos: los genes proapoptóticos *ced-3* y *ced-4* y el gen antiapoptótico *ced-9*. En mamíferos, los homólogos de *ced-3* y *ced-9* son proteasas miembros de la familia de las caspasas y *Bcl-2*, respectivamente, mientras que *ced-4* corresponde a la proteína proapoptótica *Apaf-1* que recluta caspasas al complejo de muerte. Las caspasas son componentes clave del proceso apoptótico y forman parte de una cascada proteolítica responsable de la degradación de proteínas celulares específicas. También existen moléculas que inhiben la muerte apoptótica por mecanismos distintos a los que sigue *ced-3* y *Bcl-2*, como las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), caracterizadas primero en baculovirus de insectos, habiéndose ya identificado sus homólogos en mamíferos. Se sabe que estas proteínas interactúan con las caspasas inhibiendo su activación a diferentes niveles. La caracterización de proteínas como las IAPs, así como el estudio de sus mecanismos de acción han permitido conocer los elementos reguladores de la apoptosis, lo que abre la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas para algunas patologías.

PALABRAS CLAVE: caspasas, proteínas inhibidoras de apoptosis, muerte celular programada, moléculas reguladoras.

ABSTRACT

Apoptosis is a normal event in the embryonic development as well as part of the elimination of cells in mature organisms, present also during several pathologies like neurodegenerative and autoimmune diseases were this process becomes activated. Cells undergoing apoptosis show characteristic morphological and biochemical changes resulting from the activation of a set of genes. In the nematode *Caenorhabditis elegans* programmed cell death is controlled by more than 10 different genes, among them *ced-3*, *ced-4* and *ced-9* have a critical role in cell death during development of this organism. Their homologous protein products in mammals are proteases belonging to the family of caspases, the adaptor protein *Apaf-1* and the protooncogene *Bcl-2* family, respectively. Caspases are key elements in apoptotic death, being responsible for the processing and degradation of cell proteins. Other elements in this process are regulators of cell death like the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), initially characterized in insect baculovirus and for whom mammalian homologous have been identified. IAPs seem to inhibit caspases by interacting directly or indirectly through adaptor proteins, which are required for the recruitment of caspases and their activation. The identification and characterization of IAPs, as well as the understanding of their mechanisms of action could open new therapies for different pathologies.

KEY WORDS: apoptosis, signaling pathways, regulators molecules.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso biológico muy conservado a lo largo de la escala evolutiva, el cual se asocia a la eliminación de células para el mantenimiento de la homeostasis del organismo bajo distintas condiciones fisiológicas, como el desarrollo embrionario. La apoptosis también juega un papel crítico en el origen y la evolución de ciertas patologías como enfermedades autoinmunes y algunos procesos neurodegenerativos. La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos tales como la fragmentación internucleosomal del ADN, condensación de la cromatina, encogimiento celular y la formación de cuerpos apoptóticos y la aparición de fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana celular, entre otros. En los últimos años se han identificado una gran cantidad de moléculas que participan en este fenómeno y que regulan este proceso a diferentes niveles.

La muerte apoptótica es un proceso complejo que requiere de la activación de varias señales y mecanismos de regulación, los cuales involucran la participación de una serie de moléculas con acción proapoptótica como en el caso de los miembros de la familia de las caspasas, así como antiapoptóticas como algunos de los miembros de la familia del Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). La caracterización de los genes *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* ha permitido entender el proceso de muerte celular programada con mayor detalle. Los productos proteicos de *ced-3* y *ced-4* inducen muerte celular, en tanto que el producto proteico de *ced-9*, la inhibe. El homólogo en mamíferos de *ced-4* es Apaf-1, una molécula que funciona como proteína adaptadora, mientras que los miembros de la familia del Bcl-2 son los homólogos de *ced-9* (1). El primer homólogo identificado de *ced-3* fue ICE, una proteasa de cisteína involucrada en el procesamiento de la prointerleucina 1β (2). Recientemente se han identificado diferentes proteasas que median muchos de los eventos bioquímicos que ocurren en la muerte apoptótica. Estas proteasas se conocen actualmente como caspasas y se sabe que su activación ocurre de manera secuencial y específica.

Una gran variedad de eventos generados durante el proceso apoptótico se producen en la mitocondria, incluyendo alteraciones en el transporte de electrones, la

fosforilación oxidativa y la producción de ATP, así como la liberación de moléculas proapoptóticas y su interacción con otras proteínas como algunos miembros de la familia del Bcl-2.

Muchos eventos relacionados con la regulación del proceso apoptótico ligados a la mitocondria parecen estar mediados por las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y su homólogo Bcl-x_L (Bcl-x large). Por ejemplo, la muerte apoptótica inducida por isquemia o hipoxia se inhibe tanto por Bcl-2 como por Bcl-x_L. En mitocondrias aisladas, estas proteínas aumentan la liberación de protones de la mitocondria y aumentan la capacidad de amortiguar el Ca²⁺ mitocondrial (3). Se piensa que estas proteínas antiapoptóticas podrían modificar el pH del espacio intermembranal, provocando así un aumento en la velocidad de extrusión de protones de la mitocondria.

Algunos estudios recientes han demostrado que la activación de algunas caspasas depende de la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol (4). Se ha propuesto que el citocromo c liberado forma, junto con Apaf-1 y la procaspasa-9, un complejo multiproteico que se denomina apoptosoma y que es responsable del procesamiento de la procaspasa-9 a su forma activa, la cual puede activar a su vez a otras caspasas. Las consecuencias de la liberación del citocromo c podrían depender del tipo celular. En este caso, además de la activación de caspasas, el citocromo c remanente en la mitocondria podría acoplarse al sitio de unión de alta afinidad del citocromo b-c y a la citocromo c oxidasa para mantener el transporte de electrones. Bajo estas condiciones, el consumo de oxígeno y la producción de ATP derivadas de la fosforilación oxidativa podrían mantenerse sin abatirse, mientras que las caspasas activadas podrían atacar proteolíticamente sustratos citosólicos y nucleares llevando a la célula a la muerte apoptótica. Por otro lado, en aquellas células con niveles altos de inhibidores endógenos de caspasas, la liberación del citocromo c podría asociarse a otras alteraciones como una disfunción en la cadena transportadora de electrones e incrementos en los niveles de Ca²⁺ libre y de radicales libres, lo que podría llevar a la célula a una muerte necrótica. Recientemente se ha considerado al citocromo c como un marcador de muerte apoptótica *in vivo* (5)

El factor inductor de apoptosis (AIF), otra proteína que también es liberada de la mitocondria, se transloca al núcleo como resultado de un estímulo apoptótico. Aunque los mecanismos de acción del AIF aún son controversiales, este factor induce condensación de cromatina y fragmentación de ADN en núcleos aislados y es capaz de inducir liberación de citocromo c y la activación de procaspasa-9. En algunos estudios se ha visto que su acción es bloqueada por inhibidores generales de caspasas, sugiriendo la posibilidad de que el AIF sea otra caspasa capaz de procesar procaspasas; sin embargo, otros estudios han demostrado que ninguno de los efectos del AIF se ven afectados por inhibidores de caspasas, lo que apoya la idea de que el AIF sea un efector mitocondrial de muerte apoptótica independiente de caspasas. La secuencia de aminoácidos de AIF posee una estrecha homología con oxidoreductasas de organismos vertebrados y bacterias, sugiriendo un papel como oxidoreductasa mitocondrial y efector de muerte independiente de caspasas.

La mitocondria es también una fuente importante de producción de aniones superóxido. Durante la transferencia de electrones, se estima que de 1 a 5% de los electrones de la cadena respiratoria participan en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El contenido de superóxidos y la peroxidación de lípidos se incrementa durante la apoptosis; aún no es claro si la generación de ROS es una señal de inicio o una consecuencia del proceso apoptótico. El colapso del potencial de la membrana interna de la mitocondria se considera un evento importante dentro del modelo general de apoptosis. Este proceso lleva a la apertura de un canal de alta conductancia conocido como el poro de transición mitocondrial (PTM). La apertura de este canal disiparía el gradiente de protones a través de la membrana interna, lo que desacoplaría la cadena respiratoria y favorecería la liberación del citocromo c del espacio intermembranaral de la mitocondria hacia el citoplasma. Sin embargo, algunos estudios indican que la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas ocurre antes de que se detecte la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, esto implica que el PTM podría aparecer en eventos posteriores a la activación de las caspasas mediada por el apoptosoma.

Familia de ICE/Ced-3 (Caspasas)

Las caspasas son proteasas de cisteína con una preferencia absoluta de residuos de Asp en la posición P₁ para el procesamiento proteolítico del sustrato. Hasta el momento se han descrito 14 caspasas, las cuales, a excepción de la caspasa-9, comparten una secuencia homóloga con ced-3 incluyendo el sitio catalítico con el pentapéptido QACRG (Fig 1A). Estas proteasas se sintetizan como zimógenos precursores con muy poca actividad catalítica, están constituidas por un prodomino en la región N-terminal y 2 regiones que al fraccionarse generan dos subunidades catalíticas. En el zimógeno el prodominio es altamente variable en longitud y secuencia y está involucrado en la regulación de la activación de la proenzima. Las subunidades producidas se asocian con los fragmentos de otra caspasa para formar un tetrámero cuyos sitios catalíticos funcionan de manera independiente (Fig 1B). Estas proteasas se activan cuando sufren un procesamiento proteolítico en residuos de Asp que puede estar mediado por otras proteasas o incluso puede ser autocatalizado, inducido bien por moléculas que funcionan como activadoras del procesamiento del zimógeno a enzima activa, o bien, por la remoción de moléculas inhibitoras.

La familia de las caspasas se ha dividido en 3 subfamilias: la subfamilia de la caspasa-1 dentro de la cual se encuentran la caspasa-1 (ICE), caspasa-4 (ICERel-III, TX, ICH-2), caspasa-5 (ICERel-II, TY), caspasa-11 (Ich-3), caspasa-12, caspasa-14 (MICE); la subfamilia de la caspasa-2 representada por la propia caspasa-2 (Ich.1); y la subfamilia de la caspasa-3 que incluye a la caspasa-8 (FLICE, MACH, Mch5), caspasa-9 (ICE/LAP6, Mch6), caspasa-10 (FLICE2, Mch4) caspasa-3 (Yama, CPP32, apopain), caspasa-7 (ICE/LAP3, Mch3, CMH-1), caspasa-6 (Mch2). Existe una clasificación alterna que se basa en el tamaño del prodominio. Las caspasas con grandes prodominios, como las caspasas-2, -8 y -9, funcionan como iniciadores de señales que se encuentran al principio de cascadas proteolíticas, mientras que las que presentan un prodominio pequeño, como las caspasas-3, -6 y -7, se localizan debajo de las caspasas iniciadoras y funcionan como proteasas efectoras que rompen principalmente sustratos proteicos en núcleo y citoesqueleto (6).

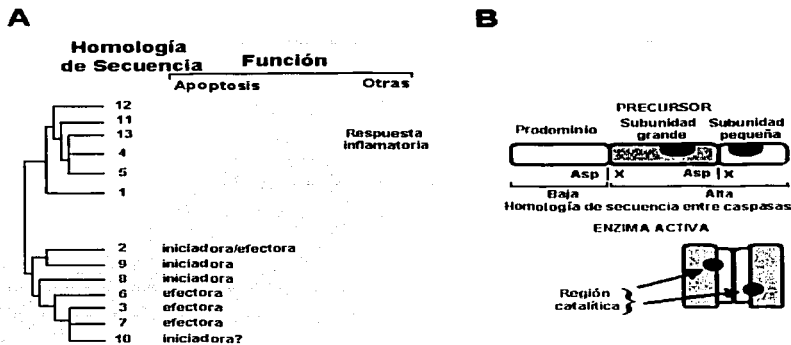


Figura 1. Función y estructura de los miembros de la familia de las caspasas. A. Las caspasas han sido identificadas desde organismos tales como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hasta el hombre. Aquí se muestran 13 de las 14 caspasas caracterizadas hasta el momento, las cuales tienen un papel importante tanto en la muerte apoptótica como en la respuesta inflamatoria. B. Las caspasas activas se componen de una subunidad grande (~20 kDa) y una pequeña (~10 kDa), cada una de las cuales contribuye estructuralmente a la formación del sitio activo. Al igual que otras proteasas, las caspasas se sintetizan como precursores o zimógenos que sufren un procesamiento proteolítico para activarse. El dominio N-terminal que es altamente variable en longitud (de 23 a 216 aminoácidos) y secuencia, está involucrado en regular la actividad de la enzima (modificado de 16)

Muchas proteínas del citoesqueleto son sustratos potenciales de varias caspasas. Un sustrato importante de la caspasa-3 es la gelsolina, una proteína reguladora que lleva a cabo múltiples funciones en citoesqueleto. Se ha demostrado el rompimiento de esta proteína durante la apoptosis *in vivo*, así como su rompimiento por acción de la caspasa-3 *in vitro*. La lámina A, una proteína constitutiva de los filamentos internos del núcleo celular es un sustrato potencial de la caspasa-6, la cual puede ser procesada y activada por múltiples estímulos. La α -espectrina no eritroide, también llamada α -fodrina, se rompe por caspasa-3 durante la muerte apoptótica de células granulares de cerebelo. Se ha demostrado en modelos *in vitro* que uno de los sustratos mejor

caracterizados de las caspasas es la proteína nuclear PARP (poli-(ADP) ribosa polimerasa), una enzima involucrada en la reparación del ADN (7). Algunos estudios indican que la caspasa-3 interactúa con varias proteínas citoplásmicas para generar la fragmentación del ADN nuclear. El factor de fragmentación del ADN (DFF), es una molécula citosólica mediadora de 2 subunidades de 40 y 45 kDa, esta última puede ser proteolíticamente procesada por la caspasa-3. Una vez que la subunidad de 45 kDa se ha procesado y es activada, se requiere para el rompimiento de sustratos nucleares tales como PARP y lamina B; sin embargo, no es necesaria para la fragmentación del ADN nuclear, la cual puede estar mediada principalmente por nucleasas dependientes de Ca^{2+}/Mg^{2+} .

La activación de las caspasas iniciadoras como las caspasas-8 y -9, requiere de la participación de moléculas acopladoras específicas, un mecanismo comúnmente observado en las proteasas en general; esta unión está mediada por al menos dos estructuras "motivo" distintas que residen tanto en el prodominio de las caspasas como en la molécula reguladora correspondiente (Fig 2A y 2B). Por ejemplo, la activación de la caspasa-8 requiere de su asociación con la proteína adaptadora FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) a través de un dominio de interacción proteica denominado DED (Death Effector Domain), en tanto que la activación de la caspasa-9 involucra la formación de un complejo con Apaf-1 a través de otro dominio de interacción proteica, CARD (Caspase Recruitment Domain) (Fig 2B). La caspasa-9 parece requerir de múltiples factores para activarse que incluyen a Apaf-1 y al citocromo c. Hay evidencias que indican la existencia de vías apoptóticas que dependen de ambas caspasas, *in vivo* e *in vitro*. El gen de la caspasa-9, también genera dos isoformas por procesamiento alternativo del transcrito primario.

Se ha propuesto que los zimógenos de las caspasas están latentes en las células en forma de monómeros y en complejos que impiden su autocatálisis, y que las moléculas reguladoras permiten que dos o más caspasas precursoras estén próximas unas a otras, permitiendo así su activación autocatalítica. El efecto de estas proteínas reguladoras puede ser directo o indirecto, removiendo alguna molécula inhibidora. En el caso de la activación de las caspasas efectoras, existen evidencias experimentales que apoyan el modelo de una cascada proteolítica mediada por la activación de los zimógenos (Fig 2) inducida por otras caspasas. Una señal proteolítica lleva a la activación de una caspasa iniciadora que a su vez procesa y activa a las caspasas efectoras, de ahí que diferentes señales apoptóticas induzcan los mismos cambios bioquímicos y morfológicos.

Familia de Ced-9/Bcl-2.

En mamíferos, el proto-oncogen *bcl-2* es funcional y estructuralmente homólogo a *Ced-9* de *C. elegans*. *Bcl-2* fue inicialmente identificado como un gen asociado al desarrollo de leucemias granulocíticas de células B, de donde deriva su nombre (B-cell leukemia gene 2). Existen dos

clases funcionalmente diferentes de proteínas relacionadas con *Bcl-2*: las proteínas antiapoptóticas como *Bcl-2*, *Bcl-x_L*, *Bcl-w*, *NR-13*, *A1*, *Boo* y *Mcl-1* y los moléculas proapoptóticas que incluye a *Bax*, *Bak*, *Bcl-x_s*, *Bad*, *Bid*, *Hrk*, *Bim* y *Bok/Mtd* (Fig 3) (8). En la estructura de estas proteínas se han identificado 4 dominios o motivos muy conservados que se conocen como regiones de homología con *Bcl-2*, denominados "Bcl-2 homology regions", BH1, BH2, BH3 y BH4. Estas secuencias son responsables en gran parte de la homo y hetero-dimerización, característica común entre los miembros de la familia. La proteína *Bcl-2* está asociada a estructuras membranales del núcleo, retículo endoplásmico y membrana externa mitocondrial, al igual que el resto de los miembros de la familia, aunque recientemente se ha encontrado que una porción de *Bax* puede encontrarse en la fracción soluble celular. Algunos estudios indican que *Bax* se redistribuye del citosol a mitocondria después de la inducción de la apoptosis y que esta proteína sufre un cambio conformacional adoptando una estructura en α -hélice anfipática que se une con gran afinidad a *Bcl-x_L*, a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La región BH3 en algunos de los miembros proapoptóticos de la familia, tales como *Bax* y *Bik*, promueve la interacción de estas proteínas con *Bcl-x_L* neutralizando la función antiapoptótica de *Bcl-x_L* y favoreciendo la muerte apoptótica.

Bcl-2/ Bcl-x_L

Diversos estudios *in vitro* indican que el producto proteico del gen *bcl-2* inhibe la muerte de células neuronales inducida por privación de suero, glucosa y factores de crecimiento. Varias proteínas antiapoptóticas que pertenecen a esta familia inhiben la muerte inducida por la activación de los receptores de muerte de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) e inhiben la activación y autoprosesamiento de la caspasa-8. *Bcl-2* se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionógico (principalmente en cerebro e hígado) disminuyendo sensiblemente en el estado adulto y vuelve a aumentar en células senescentes.

En las proteínas antiapoptóticas como *Bcl-2* y *Bcl-x_L*, los dominios BH1 y BH2 participan en el proceso antiapoptótico y en la heterodimerización de éstas con otras que promueven la muerte tales como *Bax*, en tanto

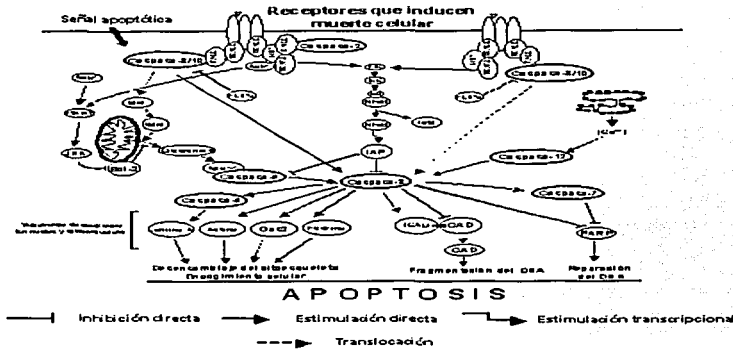
A**B**

Figura 2. Cascada de activación de caspasas y su posible regulación en células apoptóticas. A. En la apoptosis, las caspasas son las responsables directas del procesamiento proteolítico de proteínas nucleares y de citoesqueleto, que lleva al desensamblaje celular. Ellas son también responsables de regular los eventos iniciales de la muerte apoptótica. Diferentes señales proapoptóticas inducen la activación de caspasas iniciadoras, las cuales a su vez inducen la activación de las caspasas efectoras, responsables de la fragmentación proteolítica de una gran cantidad de proteínas, generando así los cambios morfológicos característicos de la muerte apoptótica. B. Las caspasas pueden ser reguladas por moléculas inhibidoras o inductoras que modifican su activación. El modelo propuesto sugiere que una señal proapoptótica induce la activación de vías de señalización en las que participan diferentes moléculas, entre ellas las caspasas, proteínas adaptadoras y "cofactores" como el citocromo c mitocondrial liberado al citosol. Algunas proteínas inhibidoras pueden sufrir modificaciones estructurales que las llevan a inactivarse. Todos estos procesos regulan la activación de caspasas. RAIDD (Recruitment apoptotic inducer with death domain), FADD (Fas-associated protein with death domain), FLIPs (FADD-like ICE inhibitory proteins), ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), TRADD (TNF-receptor associated death domain), RIP (receptor interacting protein), TRAF2 (TNFR-associated factor-2), MKK7 (MAP/Erk kinase kinase-1), tBid (truncated Bid), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (modificado de 16)

que el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos es esencial para su activación y heterodimerización. Se ha determinado que los dominios BH1, BH2 y BH3 influyen fuertemente la homo y la heterodimerización, sin embargo, no se requieren para la función de las proteínas antiapoptóticas, mientras que para aquellas que promueven la muerte son esenciales.

El mecanismo por el que Bcl-2 regula la apoptosis aún no es claro, sin embargo su localización en la membrana externa de la mitocondria podría estar relacionada con la función mitocondrial implicada en la apoptosis.

Se ha propuesto también que Bcl-2 es un poderoso antioxidante y que tiene la capacidad de interferir con las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} . Algunos estudios sugieren que las proteínas antiapoptóticas podrían funcionar inhibiendo directamente la habilidad de las moléculas parecidas a Ced-4 para inducir la activación de las caspasas (Fig 2). Recientemente se ha reportado que Bcl-x_L puede unirse también a Apaf-1 e inhibir su asociación con la procaspasa-9. Bcl-x_L presenta una distribución intracelular similar a Bcl-2, su estructura recuerda a los dominios de inserción a membranas de toxinas bacterianas; esto podría apoyar la hipótesis de que los miembros de la familia que contienen los dominios BH1 y BH2 inducen la formación de poros en organelos tales como mitocondrias, sin embargo, ni Bcl-x_L, ni Bcl-2 ni Bax forman canales en bicapas lipídicas *in vitro*, y aquellos creados por Bax y Bcl-2 tienen diferentes características que incluyen una gran selectividad iónica (9).

Bax

La inducción de la expresión de la proteína proapoptótica Bax activa un programa de muerte apoptótica que incluye disfunciones mitocondriales como alteraciones del potencial de membrana y producción de ROS sin liberación de citocromo c, así como la activación de las caspasas-3 y -9. Sin embargo, si bien no hay duda de que *in vitro* Bax puede formar heterodímeros, aún no se ha podido determinar con exactitud si Bax se une a Bcl-2 dentro de la célula y en respuesta a algún estímulo fisiológico, ya que los diferentes detergentes utilizados para la lisis celular facilitan esta asociación.

La sobreexpresión de Bax antagoniza el efecto protector del Bcl-2. En células

susceptibles a la muerte apoptótica, la porción de Bax que se localiza en el citosol normalmente se encuentra como monómero inactivo. Bax se transloca a la mitocondria en respuesta a una señal de muerte, posteriormente sufre un cambio conformacional y se homodimeriza insertándose en la membrana interna de la mitocondria. Aún en presencia de inhibidores de las caspasas, la sobreexpresión de Bax y las proteínas proapoptóticas relacionadas a ésta pueden inducir apoptosis. Se ha propuesto que Bax podría mediar la muerte independientemente de las caspasas a través de la formación de canales que podrían inducir alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (9), sin embargo, la relevancia fisiológica de este fenómeno aún es incierta. Se ha propuesto también que la actividad proapoptótica de Bax puede neutralizarse por fosforilación mediada por la cinasa AKT/PKB. Esta cinasa se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos hormonales, lo que representa un mecanismo adicional de modulación de la actividad proapoptótica de Bax.

IAPs ("Inhibitor apoptosis proteins")

En algunos de los casos, la apoptosis representa una estrategia para eliminar a aquellas células que han sido infectadas viralmente. Una respuesta adaptativa ante esta situación es la creación de mecanismos virales para inhibir este proceso de muerte (10). Las caspasas parecen ser un blanco de proteínas virales que se activan en respuesta a estímulos de muerte inducidos por las células infectadas, entre las que se encuentran, p35, crmA y las proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs), tres diferentes clases de proteínas antiapoptóticas baculovirales. Aunque los genes de las IAPs fueron originalmente descubiertos en el genoma de virus de insectos se han encontrado ya sus homólogos celulares en el genoma de insectos, aves y mamíferos incluyendo al hombre (11). Recientemente se ha descubierto que algunas de las IAPs en humanos son potentes inhibidores de caspasas y de la muerte apoptótica inducida por diversos estímulos.

Aunque las IAPs y p35 no poseen una homología de secuencia obvia, estas proteínas son funcionalmente similares. Se sabe que las IAPs, al igual que p35, ejercen sus efectos uniéndose e inhibiendo a las caspasas, como es el caso de la XIAP (12).

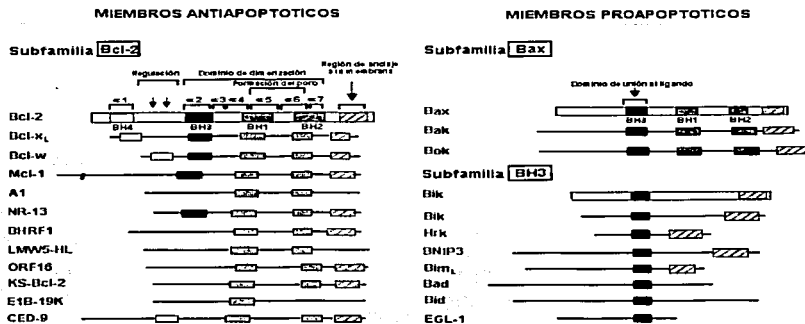


Figura 3. Miembros de la familia de CED-9/Bcl-2. Dentro de esta familia se encuentran elementos reguladores negativos del proceso de muerte o antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-x_L, así como miembros proapoptóticos como Bax y Bik, entre otros. De acuerdo a las diferencias estructurales que existen entre las diferentes proteínas se han clasificado en 3 subfamilias. El esquema muestra los dominios críticos asociados a algunas de las acciones pro y antiapoptóticas de estas proteínas (modificado de 17)

Hasta el momento se han identificado 6 proteínas de la familia de las IAPs en humanos: NAIP/cIAP1/HIAP2/Hmihb, cIAP2/HIAP1/hMIHHC, XIAP/hILP, survivina y BRUCE (13) (Fig 4A). Estas proteínas contienen en su estructura 2 motivos: un dominio N-terminal que contiene hasta 3 repeticiones imperfectas de ~70 aminoácidos, ricas en residuos de cisteína e histidina denominadas unidad de repetición tipo IAP identificada en baculovirus ("baculovirus IAP repeat" (BIR)) y un "RING finger" en la región c-terminal de unión a zinc que se encuentra en varias proteínas nucleares y citosólicas involucradas en funciones como la transcripción y reparación de ADN, proliferación y diferenciación celular. El motivo BIR es exclusivo de las IAPs y ha sido identificado en proteínas de *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en *Drosophila melanogaster* y en algunas especies de mamíferos (14). Es importante hacer notar que el dominio "RING finger" de las IAPs se localiza en la región C-terminal, mientras que en el resto de las

proteínas que lo presentan se encuentra en la región N-terminal.

En las IAPs de mamífero y las proteínas relacionadas a éstas, los dominios BIR y RING están separados por una región anfipática de 120 a 170 residuos cuyo papel aún no se ha definido. Esta región no se encuentra en las IAPs codificadas por el baculovirus (Fig 4A). La proteína inhibidora de apoptosis neuronal (NAIP) posee una homología limitada con el resto de las IAPs, sin embargo, su actividad antiapoptótica en la atrofia muscular espinal (SMA) parece ser importante. Las cIAP1 y cIAP2 de mamíferos se han identificado como componentes del complejo de señalización de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), a través de su unión al heterocomplejo TRAF1-TRAF2 (TRAF es una proteína adaptadora que forma parte del complejo de activación inducido por la unión de los receptores a TNF a su ligando). La activación del receptor de TNF α tipo 2 (TNFR2/p75) por su ligando, el TNF α , induce el reclutamiento del complejo TRAF1-cIAP al dominio citoplásmico del receptor; las IAPs no se unen directamente a

TNFR2, la unión se da a través de TRAF2. El heterómero TRAF2-cIAP2 también se ha identificado en el complejo de señalización del receptor de TNF tipo 1 (TNFR1/p55). A diferencia de éstas la XIAP, otro miembro de la familia de las IAPs, no interactúa con ninguna de las 6 proteínas TRAFs, esto sugiere que su función podría ser diferente a la del resto de los miembros de la familia (12).

Se sabe que la activación de ambos receptores, induce muerte apoptótica. El receptor TNFR2 transduce señales a través de la interacción de su dominio citosólico con la proteína TRAF2 (TNFR-associated factors 1 y 2, que también forman parte de una familia de proteínas adaptadoras) y su interacción con TRAF1 depende de la formación de un heterocomplejo con TRAF2. cIAP1 y cIAP2, son dos componentes recientemente identificados del complejo de señalización TNFR2. cIAP1 y cIAP2 interactúan con los dominios N-terminales de TNFR de TRAF1 y TRAF2 a través de los dominios BIR (Fig 4B). Esto indica que el dominio BIR, podría constituir un dominio de interacción proteína-proteína. Estudios recientes indican que las IAPs pueden reducir la muerte apoptótica o inhibirla parcialmente cuando es inducida por la sobreexpresión de FADD, una proteína adaptadora asociada al dominio de muerte citosólico del receptor CD95 (Fas/APO-1/Fas/CD95), miembro de la superfamilia de TNFR.

La habilidad de las IAPs para regular la muerte apoptótica en muchas especies radica en su capacidad de unirse e inhibir directamente a algunas caspasas; algunos de los miembros de esta familia contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), localizado entre los dominios BIR y RING finger. Este dominio se ha identificado en c-IAP1 y c-IAP2; el significado funcional de este dominio en la actividad antiapoptótica de las IAPs aún no es claro. En humanos XIAP, cIAP1 y cIAP2 son inhibidores directos de las caspasas-3 y -7, ya que previenen el procesamiento catalítico de éstas e inhiben también a la caspasa-3, inducida por la activación de receptores de la familia de TNF-R y por la liberación de citocromo c al citoplasma (15) (Fig 4B). Las IAPs no pueden bloquear el procesamiento catalítico de caspasa-3 inducido por caspasa-8, pero sí inhiben directamente a la caspasa-3 activa. Se ha demostrado que las IAPs bloquean también la

activación de la caspasa-9 inducida por el citocromo c, previniendo así la activación de la caspasa-3 y -7. Estos resultados sugieren que la caspasa-8 y el citocromo c, activan a la procaspasa-3 a través de vías independientes y que ambas pueden ser bloqueadas por las IAPs a diferentes niveles y que sólo las formas activas de caspasa-3 y -7 pueden asociarse a las IAPs cuando el estímulo se induce por la liberación de citocromo c. Se sabe también que estas proteínas se pegan a la procaspasa-9 *in vivo* previniendo su activación, bloqueando así el procesamiento de procaspasa-3 y la apoptosis. La XIAP no sólo inhibe caspasa-8 sino también a las caspasas-2 y -1. El dominio BIR de estas proteínas parece ser suficiente para proteger de muerte apoptótica (12, 15). Un sólo dominio BIR de XIAP es suficiente para bloquear el procesamiento de la procaspasa-9 inducido por el citocromo c, en tanto que el dominio RING no tiene efecto. Otros dominios identificados en la estructura de estas proteínas incluyen al dominio UBC (ubiquitin-conjugating-domain), encontrado en el dominio BRUCE. Aún no se sabe si esta proteína puede inhibir la apoptosis, sin embargo podría ser una conexión funcional entre las proteínas involucradas en el proceso de muerte apoptótica y la ubiquitina, presente en el proteasoma para la degradación de proteínas.

Existen 3 genes proapoptóticos que sólo se han identificado en *Drosophila melanogaster*, denominados reaper (*rpr*), grim y hid, de los cuales aún no se ha encontrado su homólogo en mamíferos, sin embargo Reaper y Grim pueden inducir apoptosis en células de humano, la cual puede inhibirse por las cIAPs. Reaper y Grim se unen a la región de las IAPs en donde se encuentra el dominio BIR. A través de esta interacción, las IAPs pueden regular a Reaper y Grim, alterando su distribución celular y bloqueando su acceso a las caspasas que se encuentren debajo de la cascada apoptótica inhibiendo así la muerte celular. Estos experimentos sugieren que la maquinaria de muerte celular activada por Reaper y por Grim está funcionalmente conservada entre insectos y mamíferos. Recientemente se ha identificado que Doom, una proteína en *Drosophila*, interactúa con la región C-terminal de las IAPs. Su sobreexpresión induce muerte apoptótica, la cual puede ser bloqueada por las IAPs de baculovirus.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

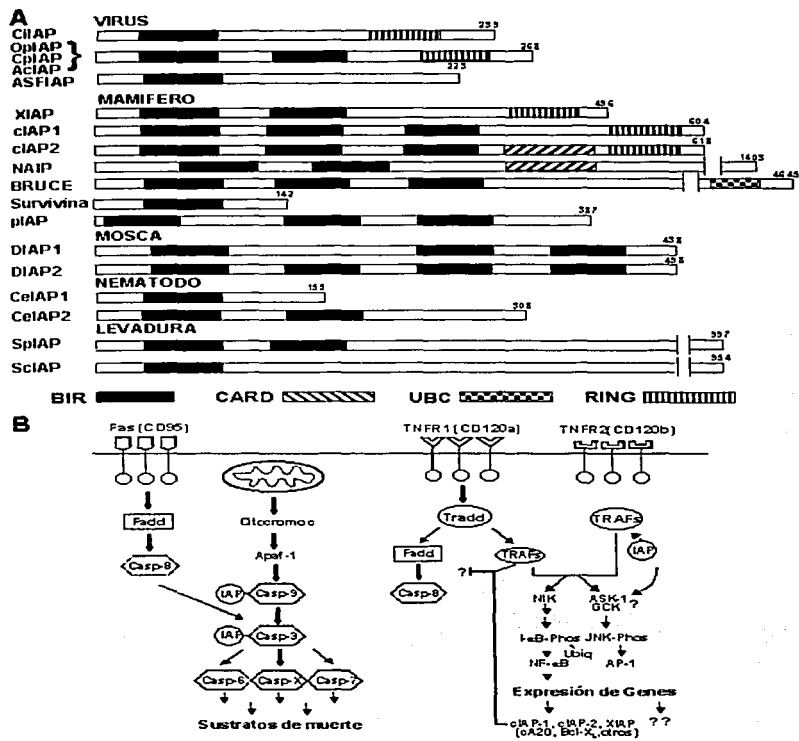


Figura 4. Miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). **A.** Todas las IAPs comparten una gran similitud en su estructura, principalmente en los dominios BIR. Aquí, está representada la estructuras y los dominios estructurales más importantes de las IAPs de varias especies: BIR (baculoviral IAP repeat); CARD (caspase adaptor recruiting domain); UBC (ubiquitin-conjugation domain in BRUCE); RING. No se ha demostrado totalmente el efecto inhibitor de la apoptosis de algunas de estas proteínas como Ac-IAP, BRUCE, ciAP de porcino y las IAPs de nemátodo y levadura. **B.** Posibles puntos de interacción de las IAPs con las vías de muerte celular. Se pueden observar las vías apoptóticas activadas por Fas (CD95), la mitocondria o el TNFR1 (CD120a). Algunos estudios indican que las IAPs de humano, pueden bloquear directamente a las caspasas-3, -7 y -9. Se sabe también que estas proteínas pueden estar involucradas en las vías de transducción de señales activadas por las proteínas adaptadoras TRAFs, a través de la activación de los receptores de muerte TNFR1 y TNFR2, así como en las vías de transducción que involucran la activación del NF-κB (modificado de14)

Otras proteínas que juegan un papel importante durante el proceso de muerte son las que pertenecen a la familia de Rel/NF- κ B, factores de transcripción que regulan la expresión de varios genes e intervienen en procesos como la proliferación, la diferenciación celular y el desarrollo. Las proteínas Rel/NF κ B están estructuralmente relacionadas a través de una región conservada N-terminal denominada "Rel homology domain" (RHD), que contiene una secuencia importante para la dimerización y unión al ADN. Las funciones de estas proteínas están también moduladas por su interacción con las proteínas inhibidoras de la familia I κ B. I κ B α , el miembro de esta familia mejor caracterizado, interactúa con homo y hetero-dímeros formados por proteínas de la familia Rel/NF κ B reteniendo el complejo en el citoplasma y cubriendo una señal de localización nuclear. Una vez que la célula recibe un estímulo, las moléculas de I κ B son rápidamente fosforiladas y degradadas por el proteasoma, permitiendo que el dímero Rel/NF- κ B se transloque al núcleo y regule así la transcripción a través de la unión a secuencias específicas denominadas sitios κ B localizadas en la región promotora de genes específicos que inducen un aumento en la frecuencia de transcripción (elementos "enhancer" o reguladores de la transcripción). Aunque la muerte celular inducida por el TNF está mediada principalmente por el receptor TNFR1, éste y el TNFR2 pueden transducir señales intracelulares que estimulan la degradación de I κ B. Las IAPs juegan un papel importante en la activación de los miembros de la familia Rel/NF κ B. La delección del dominio RING de cIAP2 genera un inhibidor dominante negativo del NF- κ B que aumenta así los efectos citolíticos del TNF. Esto sugiere la importancia funcional de la interacción entre cIAP2 y el NF- κ B que facilita una respuesta celular protectora.

Recientemente se ha propuesto que otro posible sitio de acción de las IAPs para inhibir la apoptosis es la interacción directa de éstas con algún elemento de las vías de señalización de la proteína cinasa c-Jun N-terminal (JNK) que promueve muerte apoptótica en algunos modelos celulares. Se sugiere que la sobreexpresión de cIAP2 induce la activación del NF- κ B por un mecanismo que involucra la inactivación de I κ B. Se sabe también que el NF- κ B puede suprimir la activación de las caspasas

y que puede afectar negativamente a otras proteínas antiapoptóticas.

La survivina, otro miembro de esta familia de proteínas inhibidoras de apoptosis, se expresa en proporciones muy altas en células cancerosas de humanos. A diferencia de otras IAPs, esto parece indicar que la expresión de la survivina define un evento común asociado a la patogénesis de una gran variedad de cánceres humanos. En condiciones normales, hay bajos niveles de expresión de survivina en tejido adulto. El promotor del gen de esta proteína contiene 4 copias de elementos represores de la fase G1, que están implicados en controlar la periodicidad del ciclo celular de algunos genes que regulan las fases G2/M. Se le ha encontrado asociada a microtúbulos del uso mitótico de células en mitosis, una reacción regulada por la actividad dinámica de los microtúbulos. La pérdida de interacción de survivina con los microtubulos durante la mitosis induce la pérdida de su función antiapoptótica y un aumento en la actividad de la caspasa-3. Estas evidencias indican que esta familia de proteínas está evolutivamente conservada y que tiene diferentes mecanismos de acción para ejercer sus efectos antiapoptóticos. Aún no se ha determinado con exactitud el significado fisiológico de estas proteínas en células de mamífero; sin embargo, su amplia distribución en los diferentes tipos celulares y su capacidad para interactuar directamente con parte de las moléculas clave del proceso apoptótico e inhibir el proceso de muerte en diferentes puntos de la cascada de activación, las convierte en componentes importantes de la maquinaria celular que le permiten a ésta responder a los diferentes estímulos externos a los que está expuesta.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las moléculas que participan en la muerte por apoptosis constituyen elementos clave de un proceso altamente conservado y elemental para el mantenimiento de la homeostasis celular, así como para la adecuada formación de tejidos durante el desarrollo embrionario de los mamíferos. Sabemos ahora que la muerte apoptótica está regulada de manera muy sofisticada en los distintos niveles presentes en la cascada de señales en este proceso. Parecería ser que existen distintas vías apoptóticas que dependen del tipo celular y del agente inductor, y que la mayor parte de estas

vías convergen en la activación de las caspasas. Estas caspasas, sin embargo, pueden ser reguladas a su vez por inhibidores endógenos selectivos o sobrepasadas por factores que inician la degradación ordenada del ADN. Así, la relación entre los distintos elementos moleculares presentes en un momento dado de la vida de la célula definirá cuando y como morirá ésta. Esto convierte a la muerte apoptótica, junto con los procesos de diferenciación y proliferación celular, en uno de los eventos más complejos que las células tienen que salvaguardar para el mantenimiento de sus funciones vitales. Esto, junto con la gran diversidad de patologías que involucran a la muerte apoptótica, ha abierto la posibilidad de estrategias terapéuticas en el tratamiento de algunas enfermedades asociadas al envejecimiento, neurodegeneración, inmunodeficiencia, autoinmunidad y muchas formas de cáncer.

REFERENCIAS

- 1) Reed J (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1-6.
- 2) Thornberry N, Bull, H, Calaycay J, Chapman R, Howard A., Kostura M, Miller D, Molineaux S, Weidner J y Aunins J (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin -1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
- 3) Shimizu S, Eguchi W, Kamiike Y, Funahashi A., Mignon V, Lacroque H, Matsuda y Y Tsujimoto (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1455-1459.
- 4) Lui X, Zou H, Slaughter C y Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- 5) Renz A, Berdel WE, Kreuter M, Belka C, Schulze-Osthoff K y Los K (2001) Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death *in vivo*. *Blood* 98:1542-1548.
- 6) Grossmann J, Walther K, Astinger M, Kiessling S y Schölmerich J (2001) Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 12:147-155.
- 7) Nicholson WD, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallart M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik TA, Munday NA, Rajau SM, Smulson ME, Yamin T-T, Yu VL y Miller DK (1995) Identification and inhibition of ICE/CED-3 proteases necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- 8) Song Q, Kuang Y, Dixit VM y Vincenz C (1999) Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18:167-78.
- 9) Green RD y Reed CJ (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281:1309-1311.
- 10) Salvensen GS y Dixit VM (1997) Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:131-139.
- 11) Harvey NL, AJ, Butt y S Kumar (1997) Functional activation of Nedd2/ICH-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem* 272:13134-13139.
- 12) Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli JK, Thompson BC y Armstrong R (1998) Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-X_L and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 18:608-615.
- 13) Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeba J-E, MacKenzie A y Korneluk EG (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353.
- 14) Devereaux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS y Reed JC (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18:5242-5251.
- 15) Devereaux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS y Reed JC (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17: 2215-2223.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN