



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PAPEL DE SMAC/DIABLO EN LA
MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO
INDUCIDA POR BAJO POTASIO Y
ESTAUROSPORINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
PAOLA MAYCOTTE GONZÁLEZ



Tutor: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

MÉXICO, D. F.

Febrero, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
ANTECEDENTES	4
Apoptosis	4
Proteínas Inhibidoras de Apoptosis	8
Smac/DIABLO.....	10
Cerebelo y Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC).....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
17	
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	
19	
Cultivos celulares	19
Viabilidad celular	20
Condensación nuclear	20
Inmunoblots	20
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	
22	
Efecto de K5 y STS en la muerte de NGC	
22	
Expresión de la proteína Smac/DIABLO en NGC.....	
23	
Experimentos con el péptido N7.....	26
A. Viabilidad	26
B. Condensación Nuclear.....	31

DISCUSIÓN	_____	34
CONCLUSIONES	_____	36
REFERENCIAS	_____	37

RESUMEN

La muerte apoptótica es un proceso evolutivamente conservado, es necesaria durante el desarrollo embrionario y es parte de un proceso de eliminación de células en organismos maduros. También se presenta en diversas patologías como en el caso de enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y cáncer. Las células apoptóticas presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan de una serie de eventos controlados genéticamente. 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. Algunas de estas moléculas tienen acción pro-apoptótica como en el caso de la familia de las caspasas, o anti-apoptótica como algunos de los miembros de la familia de Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (Caballero-Benítez y Morán, 2002).

Las neuronas en particular están sujetas tanto en el desarrollo como en el estado maduro a señales que promueven la sobrevivencia o que inducen muerte celular. Du *et al* y Verhagen *et al* reportaron en 2000 la identificación de una proteína que promueve la activación de caspasas dependiente de citocromo c /Apaf-1 evitando la actividad de las IAPs y la llamaron Smac/DIABLO. Existen evidencias en modelos distintos a las neuronas granulares de cerebelo (NGC) donde Smac/DIABLO tiene un papel crítico en la cadena de muerte en respuesta a ciertas señales. A pesar de su importancia, existe poca información sobre Smac/DIABLO desconociéndose su posible papel en la muerte de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

En el presente trabajo, se identificó la presencia de Smac/DIABLO en NGC en cultivo y no se encontró un papel específico de Smac en la regulación de la muerte o sobrevivencia de las células ante dos distintos tratamientos inductores de muerte (cambio a condiciones no despolarizantes y estaurosporina). Sin embargo, los

resultados sugieren que Smac podría estar participando en la regulación de la activación de caspasas en procesos distintos a la muerte, como el desarrollo de las NGC crecidas crónicamente en condiciones no despolarizantes.

ABREVIATURAS

AIF: Apoptosis Inducing Factor
ATP: Adenosine Tri-Phosphate
Apaf-1: Apoptotic Protease Activating Factor-1
Bcl-2: B-Cell Lymphoma Protein 2
BH-3: Bcl-2 Homology Domain-3
BIR: Baculoviral IAP Repeat
BMP: Bone Morphogenic Protein
CARD: Caspase Recruitment Domain
c-IAP1: Cellular Inhibitor of Apoptosis 1
c-IAP2: Cellular Inhibitor of Apoptosis 2
dATP: deoxy-Adenosine Tri-Phosphate
DD: Death Domain
DED: Death Effector Domain
DFF-45: DNA Fragmentation Factor-45
DIABLO: Direct IAP Binding Protein with Low Isoelectric Point
DISC: Death Inducing Signaling Complex
DIV: Días *In Vitro*
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: Desoxyribonucleic Acid
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid
FADD: Fas Associated Death Domain
IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins
IBM: IAP Binding Motif
ICAD: Inhibitor of Caspase Activated DNase

ILP: IAP-Like Protein
IMP: Inner Membrane Peptidase
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
MAP: Mitogen-Activated Protein
mRNA: RNA (Ribonucleic Acid) Mensajero
NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NGC: Neuronas Granulares de Cerebelo
PARP: Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa
PBS: Phosphate Buffer Saline
Smac: Second Mitochondria Derived Activator of Caspases
STS: Estauosporina
tBid: truncated Bid
TNFRs: TNF Receptors
TRADD: TNFR1-Associated Death Domain Protein
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
UV: Ultravioleta
XAF-1: XIAP Associated Factor-1
XIAP: X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein

ANTECEDENTES

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se define por algunos cambios morfológicos de la célula (Kerr *et al*, 1972), incluyendo una condensación de cromatina, disminución en el volumen celular, alteraciones en la membrana plasmática y formación de vesículas que constituyen los cuerpos apoptóticos. *In vivo*, este proceso culmina con la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por otras células evitando complicaciones que resultarían de la liberación del contenido intracelular. Esta fagocitosis se da como resultado del reconocimiento de la fosfatidil serina por los fagocitos después de que ésta se ha translocado de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática de la célula en apoptosis. Además, durante la apoptosis en su forma más clásica, se observa la activación de una familia de proteasas llamada caspasas, en particular la caspasa-3 (Hengartner, 2000; Savill y Fadok, 2000).

Las caspasas constituyen una familia de proteasas con una cisteína en su sitio activo y que cortan a su sustrato después de un residuo de ácido aspártico. Para la catálisis necesitan reconocer por lo menos cuatro amino ácidos hacia el extremo amino del sitio de corte. A pesar de que muestran similitud en su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por sustrato, el motivo de reconocimiento tetrapeptídico difiere significativamente entre caspasas y explica la diversidad de sus funciones biológicas (Thornberry *et al*, 1997). Estas proteasas se expresan como proenzimas (30 a 50 kDa) con tres dominios: un dominio amino terminal, una subunidad grande (alrededor de 20 kDa), y una subunidad pequeña (alrededor de 10 kDa). Una señal pro-apoptótica activa a una caspasa iniciadora, lo que a su vez activa a las caspasas efectoras, resultando en el corte de blancos que llevan a las características morfológicas de la apoptosis.

La activación de las caspasas comprende un procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido por la asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. Las estructuras cristalinas de las caspasas-1 y 3 muestran dos heterodímeros que se asocian para formar un tetrámero, con dos sitios catalíticos que funcionan independientemente (Thornberry y Lazebnik, 1998). Actualmente, se propone que las caspasas efectoras se activan por proteólisis, que las caspasas iniciadoras se activan por dimerización y que el corte en estas últimas sirve para estabilizar el dímero (en el caso de la caspasa-8) o para facilitar la unión a IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis), en el caso de la caspasa-9 (Boatright *et al.*, 2003). Hasta el momento se han descrito dos vías de activación de caspasas: la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis (Figura 1).

La vía intrínseca se activa por diversas señales de estrés (proteínas supresoras de tumores como p53, oncogenes como c-Myc, daño al DNA, agentes quimioterapéuticos, privación de suero y radiaciones UV), las cuales inducen la liberación de proteínas mitocondriales. Por lo regular, esta liberación ocurre después de que miembros BH-3 (Bcl-2 Homology Domain-3, los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2) se unen y neutralizan a miembros anti-apoptóticos de la misma familia, lo que promueve la liberación de proteínas mitocondriales incluyendo al citocromo c. El citocromo c citoplásmico interactúa con Apaf-1 y la pro-caspasa-9, los cuales unen dATP o ATP para formar un complejo llamado apoptosoma. Este complejo dimeriza y por lo tanto activa a la caspasa-9. El principal blanco de la caspasa-9 activa es la procaspasa-3, una de las caspasas efectoras más importantes. La caspasa-3 activa, compuesta de un heterotetrámero de subunidades p17 y p12, puede proteolizar una gran variedad de sustratos, incluyendo caspasa-2, caspasa-6, lámina nuclear, proteína cinasa dependiente de DNA y factor de fragmentación de DNA 45 (DFF45 o ICAD), entre otros (Shi, 2001). Otras proteínas mitocondriales liberadas que promueven la apoptosis

incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), Smac/DIABLO, la endonucleasa G y Omi/HtrA2. En el caso de Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, la salida de la mitocondria de estos factores puede suprimir el efecto inhibidor de las IAPs (Thorburn, 2004).

La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos a receptores de muerte, como los receptores de factor de necrosis tumoral (TNFRs), Fas o TRAIL. Aunque los receptores de muerte pueden promover crecimiento celular en algunas circunstancias, la capacidad de estos receptores de inducir apoptosis es crítica en varios procesos patológicos. Los receptores de muerte conocidos contienen un dominio intracelular de interacción con proteínas globulares llamado dominio de muerte (DD). Después de la unión de ligandos a trímeros de receptor, los receptores activados reclutan una proteína adaptadora llamada dominio de muerte asociada a Fas (FADD). FADD tiene dos dominios de interacción con proteínas: un dominio de muerte y un dominio efector de muerte (DED). FADD se une directamente (o via otro adaptador como TRADD, que se une al TNFR2) al receptor a través de interacciones entre dominios de muerte y a la procaspasa-8 a través de interacciones DED para formar un complejo en el receptor llamado el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). La caspasa-8 entonces se dimeriza y se activa. La proteína BH3 de la familia de Bcl-2, Bid, es cortada por la caspasa-8 y se transloca a la mitocondria para activar la vía intrínseca, conectando las dos formas de activación de las caspasas y amplificando la señal de la vía de receptores de muerte (Thorburn, 2004).

En el desarrollo del sistema nervioso central de los vertebrados, ocurre normalmente una pérdida masiva de células que probablemente tenga dos funciones principales: ajustes cuantitativos de poblaciones de neuronas y eliminación de proyecciones incorrectas o aberrantes. Por lo tanto, cualquier perturbación en las señales que llevan a la muerte celular en estas situaciones puede resultar en

desarrollo aberrante de la estructura y función alterada del sistema nervioso (Oppenheim, 1991).

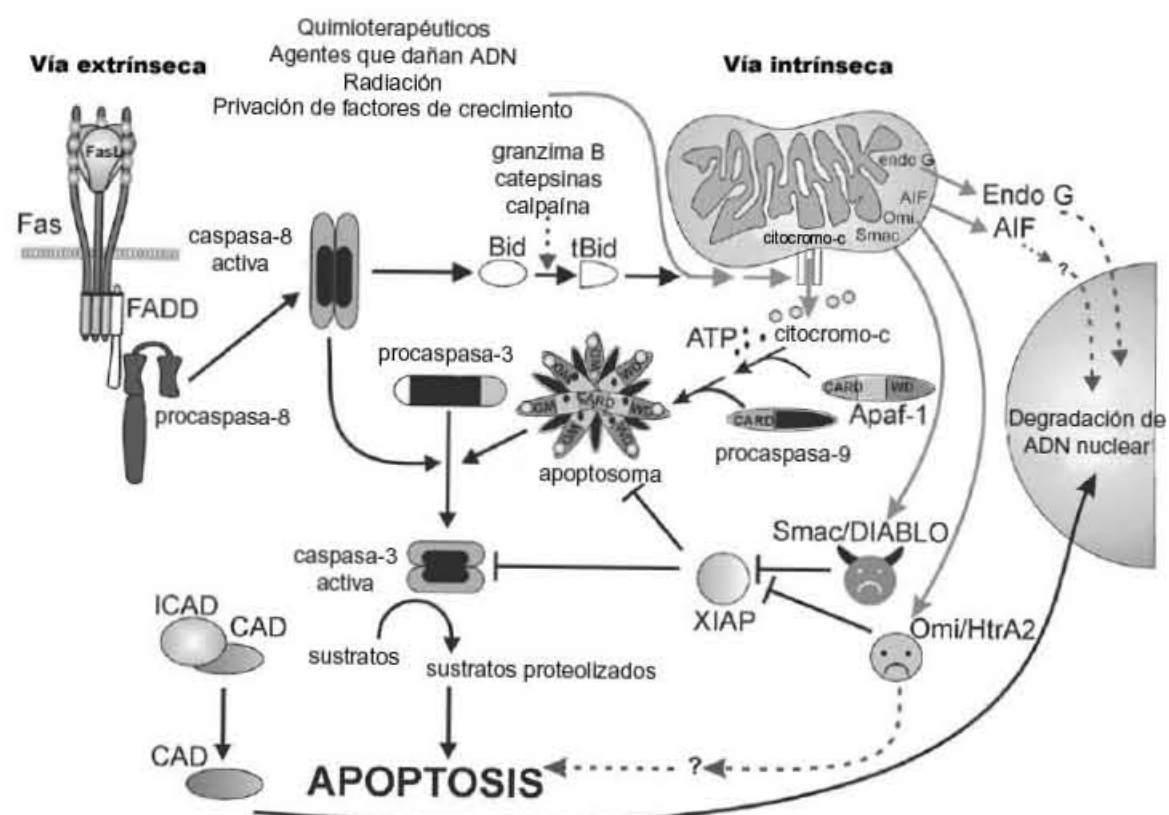


Figura 1. Vías de apoptosis. Una variedad de estímulos apoptóticos (receptores de muerte, quimioterapéuticos, agentes que dañan al DNA, privación de soporte trófico y radiación) producen la liberación de moléculas proapoptóticas de la mitocondria como el citocromo c, AIF, endonucleasa G, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 que posteriormente activan a las caspasas. El citocromo c induce la activación de caspasas uniéndose a Apaf-1, a la procaspasa-9 y ATP para formar el apoptosoma. Smac y Omi pueden neutralizar la inhibición de caspasas por las IAPs (XIAP). AIF y la endonucleasa G, por su parte, provocan degradación de DNA independiente de caspasas. Por otro lado, los receptores de muerte al unirse a su ligando reclutan proteínas adaptadoras que posteriormente reclutan y activan a la caspasa-8. La caspasa-8 activa puede proteolizar y activar a la procaspasa-3, o bien, proteolizar a Bid para formar tBid el cual puede promover la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria. Ambas vías convergen en la activación de la caspasa-3, la principal caspasa efectora que proteoliza sustratos que provocan la morfología apoptótica (CAD: Caspase-Activated DNase, ICAD: Inhibitor of CAD). (Modificado de van Gurp M *et al*, 2003).

Proteínas Inhibidoras de Apoptosis

La familia de las IAPs incluye proteínas que contienen un dominio BIR (Baculoviral IAP Repeat), cuyo nombre deriva de los supresores de apoptosis en el genoma del baculovirus. Algunas IAPs también contienen un dominio RING de unión a zinc, cuya función es catalizar la degradación de ellas mismas y marcar proteínas para ubiquitinación, y un dominio CARD que puede interactuar con procaspasa 9 y Apaf-1. Estos dominios son esenciales para la actividad anti-apoptótica de las IAPs, la cual se ha asociado a la unión y consecuente inhibición de las caspasas (Figura 2).

Hasta ahora, se han descrito ocho miembros de las IAPs en humanos, que incluyen: NAIP, c-IAP1 (HIAP2, MIHB), c-IAP2 (HIAP1, MIHC), XIAP (ILP-1, MIHA), survivina (TIAP), ILP-2 (Ts-IAP), ML-IAP (Livina, KIAP) y Apollon (Bruce). XIAP, c-IAP1, c-IAP-2 y survivina unen e inhiben a las caspasas 3, 7 y 9, pero no a las caspasas-1, 6, 8 y 10. El dominio BIR-3 de XIAP une directamente a la subunidad pequeña (carboxi-terminal) de la caspasa-9 y el corte de la misma parece ser necesario para su interacción con XIAP. Por otro lado, XIAP une a las caspasas-3 y 7 por un segmento amino-terminal de BIR-2. Este dominio une a las caspasas-3 y 7 de manera reversible pero con alta afinidad y resulta en un impedimento estérico para la unión de sustratos normales de estas caspasas (Deveraux y Reed, 1999 y Salvesen y Duckett, 2002).

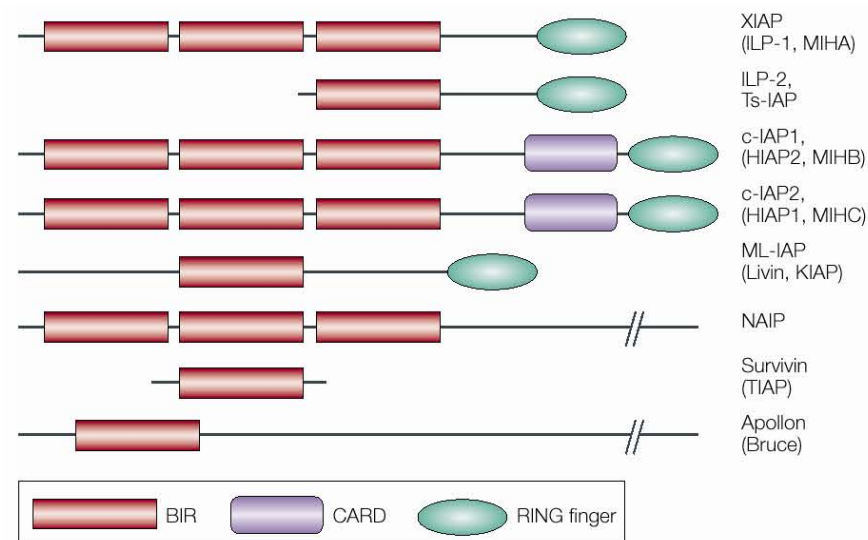


Figura 2. Estructura de proteínas inhibidoras de apoptosis, señalando los dominios BIR, CARD y RING (Tomado de Salvesen y Duckett, 2002).

Las IAPs pueden estar reguladas a varios niveles. La expresión de la survivina depende del ciclo celular y *c-IAP2* y XIAP se regulan por NF- κ B. Post-transcripcionalmente, la concentración intracelular de IAPs puede regularse por ubiquitinación y la actividad de las mismas se regula por proteínas reguladoras de las IAPs, como Smac/DIABLO (Du *et al* y Verhagen *et al*, 2000), Omi/HtrA2 (Suzuki, 2001) y XAF-1 (Liston *et al*, 2001). Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 son proteínas mitocondriales que al salir al citosol exponen un motivo de unión a IAPs (IBM) que consta de un tetrapéptido evolutivamente conservado en la región amino terminal de las formas maduras de las mismas (Deveraux y Reed, 1999 y Salvesen y Duckett, 2002). XAF-1, por su parte, cuando se sobre-expresa junto con XIAP, la redistribuye del citosol al núcleo e impide su acción antiapoptótica (Liston *et al*, 2001).

Por otro lado, se han descrito otras funciones de las IAPs independientes de su unión a caspasas. La survivina, por ejemplo, tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y parece estar involucrada en el ensamble del huso cromático (Rosa *et al*, 2006). *c-IAP-2*, por su parte, puede estimular la transcripción

mediada por Nf-kB, el cual a su vez, induce la expresión de genes antiapoptóticos (Chu *et al*, 1997). Las IAPs también se han visto involucradas en la vía de transducción de las MAP (Mitogen-Activated Protein) cinasas. XIAP, NAIP y ML-IAP pueden activar a JNK1. XIAP puede interactuar con el receptor para la proteína BMP (Bone Morphogenic Protein) y con TAB1, un co-factor de TAK1, una MAP cinasa (Nachmias *et al*, 2004).

En neuronas granulares de cerebelo de rata, se ha encontrado expresión del mRNA de RIAP2 (IAP2 de rata), pero no se ha observado el de XIAP, RIAP1 y NAIP. Se ha encontrado también que la sobre-expresión de IAPs retarda, pero no evita la muerte celular por privación de potasio y evita el procesamiento de las procaspasas-8 y 9 (Simons *et al*, 1999; Gerhardt *et al*, 2001). Por último, en otros trabajos del laboratorio, se ha encontrado la expresión de la proteína de XIAP, cIAP1, cIAP2 y survivina en NGC crecidas en condiciones despolarizantes. Los niveles de c-IAP1 y 2 disminuyen cuando las NGC se tratan con cambio a bajo potasio y estaurosporina, mientras que XIAP y survivina parecen no modificarse (Blancas y Morán, en preparación).

Smac/DIABLO

Verhagen *et al* en 2000, buscando ligandos endógenos de las IAPs, co-inmunoprecipitaron de la línea celular 293T a XIAP junto con una proteína de 23 kDa con un bajo punto isoeléctrico (5.3) a la que llamaron DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI). Por su parte, en el mismo año, Du *et al*, observaron que los extractos celulares de células HeLa con detergentes tenían mayor capacidad de activar a la caspasa-3 que aquellos que no los tenían y aislaron un componente mitocondrial que promovía la activación de la caspasa-3, pero que no podía funcionar en ausencia de Apaf-1, citocromo c o procaspasa-9. Llamaron a este componente Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases).

Smac/DIABLO se sintetiza como una proteína de 237 aminoácidos cuyos 55 residuos amino terminales sirven como una secuencia de localización mitocondrial. Esta secuencia amino terminal se corta aparentemente por el complejo IMP (Peptidasa de la Membrana Interna) para generar la forma madura de Smac con la secuencia amino terminal A⁵⁴VPI que es el motivo de unión a IAPs (IBM, Burri *et al*, 2005). La forma madura de Smac contiene 184 aminoácidos y se comporta como oligómero en solución, con un peso aparente de 100 KDa (Du *et al*, 2000). El cristal de Smac (Chai *et al*, 2000) solamente muestra una forma homodimérica cuyas interacciones entre monómeros están dadas por residuos hidrofóbicos a través de interacciones de Van der Waals. El mRNA de Smac/DIABLO se ha encontrado en corazón, hígado, riñón y testículo de ratón (Verhagen *et al*, 2000) y en tejidos humanos, siendo su mayor expresión en testículo, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario. Se encontró también en bajas cantidades en cerebro, pulmón, timo y leucocitos periféricos humanos (Du *et al*, 2000).

La proteína Smac/DIABLO interacciona con todas las IAPs que se han estudiado, incluyendo XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Op-IAP, survivina, Bruce y ML-IAP (Du *et al*, 2000; Verhagen *et al*, 2000; Vucic *et al*, 2002; Bartke *et al*, 2004; Hao *et al*, 2004). Smac/DIABLO se une como dímero al dominio BIR-2 de XIAP, el cual puede unir a las caspasas- 3 y 7 (Chai *et al*, 2000), y como monómero o como dímero al dominio BIR-3 de XIAP (el cual une caspasa-9) (Riedl *et al*, 2001). Por lo tanto, Smac promueve la apoptosis eliminando el efecto inhibitor de las IAPs. Puede inducir la activación de la procaspasa-3 quitando el efecto inhibitor sobre la caspasa-9, o puede promover la actividad enzimática de la caspasa-3 madura quitando el efecto inhibitorio sobre la misma. Los 4 residuos amino terminales de Smac madura son indispensables para su función, ya que la mutación en el primero de estos residuos la vuelven completamente inactiva (Chai *et al*, 2000). El cristal Smac/BIR-3 (Wu *et al*, 2000 y Liu *et al*, 2000) muestra que estos 4 residuos de Smac son responsables de la

interacción más importante con XIAP-BIR3 y que los péptidos amino terminales de Smac se unen a XIAP-BIR3 con la misma afinidad que la proteína completa. Además, un péptido con los 7 residuos amino terminales de Smac (Smac N7) pueden activar a la caspasa-3 *In Vitro* en presencia de XIAP (Chai *et al*, 2000) y este mismo péptido fusionado al homeodominio de antenapedia para hacerlo permeable, aumenta la apoptosis medida como condensación nuclear inducida por agentes quimioterapéuticos en la línea celular MCF-7 (Arnt *et al*, 2002).

A pesar de que en un principio se vinculó a Smac con la vía intrínseca de la apoptosis por su unión a XIAP-BIR3, que activa la caspasa-9, recientemente Deng *et al* (2003) reportaron que la activación de la caspasa-8, mediada por TNF α , requiere de JNK, Bid y Smac/DIABLO, y que esta activación es independiente de la vía intrínseca de la apoptosis.

El gen de Smac se localiza en el brazo q del cromosoma 12 y contiene 7 exones, con la prosequencia codificada por los exones 1, 2 y 3. A la fecha se han descrito 4 formas de expresión alternativa de Smac (Figura 3): Smac β (S), γ y δ (Roberts *et al*, 2001 y Srinivasula *et al*, 2000). Smac β ó S contiene en su prosequencia sólo la región codificada por el exón 2 del gen. Cuando se sobreexpresa en líneas celulares se ha observado localizada en la cara interna de la membrana plasmática (Roberts *et al*, 2001) y en el citoplasma (Srinivasula *et al*, 2000) y no muestra una relocalización por estímulos apoptóticos. Probablemente sufre un corte intracelular ya que migra por abajo del peso predicho (21.2 kD). Roberts *et al* (2001) no encontraron unión a XIAP por inmuno-precipitación a pesar de tener motivo de unión a IAPs (IBM), pero Srinivasula *et al* encontraron que une BIR1/2, pero no BIR3 de XIAP por ensayos de interacción *in Vitro*. Además, promueve apoptosis inducida por TRAIL, TNF, etopósido y el inhibidor del proteosoma MG132 por lo que debe tener una acción proapoptótica independiente de la inhibición de IAPs. Smac γ puede tener una localización parecida a Smac

β porque no contiene las secuencias codificadas por los exones 2 y 3 de la secuencia de localización mitocondrial y probablemente pueda unir IAPs débilmente ya que el sitio de unión a IAPs (codificado por el exón 4) no se encuentra completo (Srinivasula *et al*, 2000).

Smac δ (o Smac 3) contiene una secuencia de localización mitocondrial intacta y se libera de la mitocondria después de un estímulo apoptótico. El mRNA de Smac 3 se encontró expresado ubicuamente en tejidos humanos y la proteína promueve la degradación de XIAP por el proteosoma cuando se sobre expresan en líneas celulares; Smac/DIABLO no tiene este efecto. Por otro lado, cuando se sobre expresa en la línea celular HeLa, no produce apoptosis, por lo que se propone que la función proapoptótica de Smac independiente de IAPs pueda estar en la secuencia codificada por el exón 4 (Roberts *et al*, 2001 y Fu *et al*, 2003).

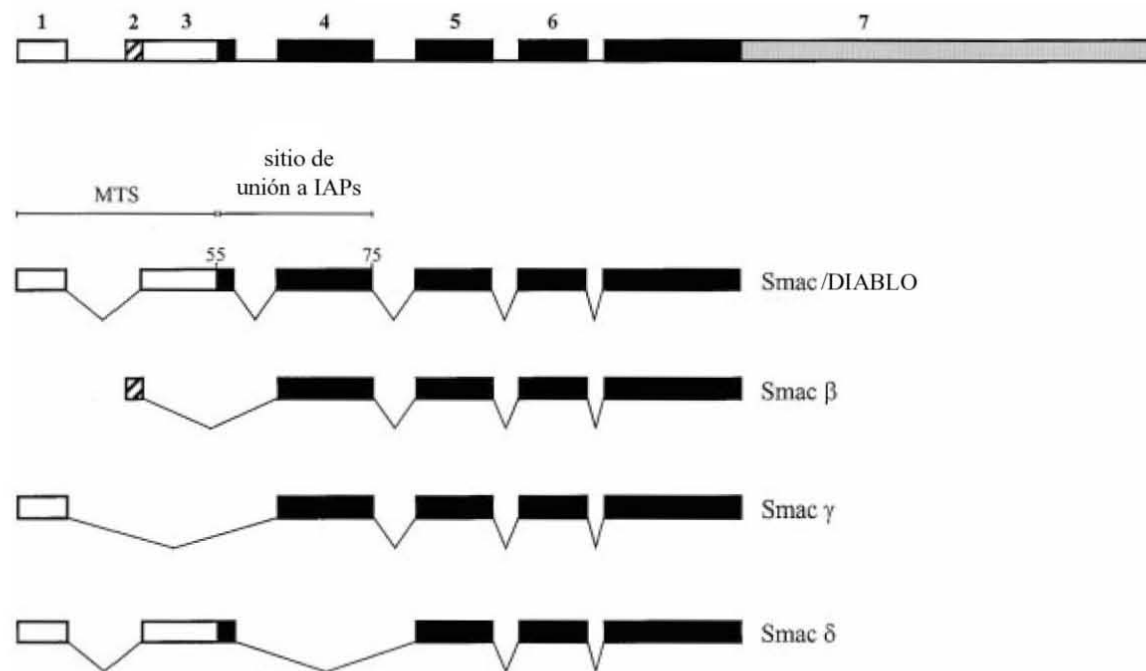


Figura 3. Smac existe en varias formas de expresión alternativa. El gen de Smac tiene 7 exones y las formas de splicing tienen cambios ya sea en la secuencia de localización mitocondrial (MTS) o el motivo de unión a IAPs. La región no codificante se muestra en gris (tomado de Roberts *et al*, 2001).

Al igual que las IAPs, se ha propuesto que los niveles intracelulares de Smac pueden regularse post-transcripcionalmente por ubiquitinación. MacFarlane *et al* (2002) detectaron ubiquitinación de Smac por XIAP en un ensayo de ubiquitinación *in Vitro*. Sin embargo, Silke *et al* (2004) no observaron ubiquitinación de Smac al sobre expresarla con XIAP en líneas celulares y Hu y Yang (2003) observaron ubiquitinación de Smac por cIAP1 y 2, pero no por XIAP al sobre expresarlas en la línea celular 293T, pero no en HeLa. También BRUCE/Apollon, una IAP que funciona como ubiquitin-ligasa, puede unir y ubiquitinar Smac (Bartke *et al*, 2004 y Hao *et al*, 2004). La ubiquitinación de Smac puede regularse también por su interacción con otras proteínas. Recientemente, se describió que NADE (p75 NTR-associated death executor) puede unir el complejo Smac-XIAP e inhibir la ubiquitinación de Smac por XIAP (Yoon *et al*, 2004). Por otro lado, Yang *et al* (2004) reportan que Smac también induce ubiquitinación y degradación de cIAP1 y 2 dependiente de su motivo de unión a IAPs y la ubiquitinación de XIAP y Livina, pero no su degradación cuando se sobre-expresan en líneas celulares.

Existen reportes en diversos modelos que sugieren que Smac/DIABLO es un punto decisivo que determina si una célula entra en apoptosis o si sobrevive (Srinivasula *et al*, 2000, Sun *et al*, 2002 y Takasawa *et al*, 2003). El papel de Smac en el Sistema Nervioso Central se ha estudiado en daño isquémico (Saito *et al*, 2003), en daño traumático al cerebro (Lotocki *et al*, 2003), y en alteraciones inducidas por hipotiroidismo en neuronas granulares de cerebelo (Singh *et al*, 2003). Saito *et al* (2003) describieron un aumento en los niveles de XIAP, aunada a una mayor liberación de Smac de la mitocondria y a un aumento en los niveles de la caspasa-9 activa durante la reperfusión en un modelo *in Vivo* de isquemia transitoria focal. Por su parte, Lotocki *et al* (2003) encontraron niveles semejantes de Smac en lisados de cerebro de rata adulta normales y en los sometidos a un daño traumático moderado y Singh *et al* (2003) encontraron que una deficiencia en la

hormona tiroidea provoca la salida de factores proapoptóticos de mitocondrias de cerebelo en desarrollo, como Smac, AIF y el citocromo c.

Cerebelo y Neuronas Granulares de Cerebelo (NGC)

El cerebelo está constituido por 5 tipos neuronales localizados en la corteza: las neuronas granulares, que utilizan glutamato como neurotransmisor, las células de Golgi, que contienen GABA (ácido γ -aminobutírico) y glicina, y las células estrelladas, de canasta y de Purkinje que son GABAérgicas. Las neuronas de Purkinje representan la principal vía de salida de la corteza cerebelar, proyectando a los núcleos cerebelares profundos.

La función del cerebelo es recibir información sensorial de la periferia para modular el movimiento y equilibrio del cuerpo. La información sensorial sobre el movimiento y la posición de las partes del cuerpo proviene de un grupo de núcleos en el tallo cerebral perteneciente al sistema pre-cerebelar. Estos núcleos, con excepción del núcleo inferior olivar, proyectan a las neuronas granulares, que se comunican con las células de Purkinje del cerebelo. Los axones del núcleo inferior olivar proyectan directamente a las células de Purkinje. Las neuronas de los núcleos cerebelares profundos finalmente proyectan a la corteza cerebral, mediando el control de los movimientos motores y el equilibrio. Además de coordinar el movimiento, el cerebelo se ha implicado también en el aprendizaje motor y funciones cognitivas (Wang y Zoghbi, 2001).

Las neuronas granulares de cerebelo (NGC) son las más abundantes del cerebro de los mamíferos. En la rata, las NGC son generadas postnatalmente por células en división de la capa germinal externa. Esta capa permanece en la rata hasta el día 21 postnatal y consta de dos zonas: la zona superficial proliferativa y la zona premigratoria. Las NGC inmaduras migran desde su sitio de origen a través de estas

capas hasta la capa granular. Este proceso de proliferación y migración ocurre durante las primeras 3 semanas postnatales en el cerebelo de la rata. Las NGC son finalmente inervadas por los axones de las fibras musgosas provenientes del tallo cerebral y reciben las conexiones sinápticas inhibitoras de las células de Golgi en el glomérulo a partir del día 12 postnatal. Durante la segunda y tercera semana postnatales, las NGC establecen el mayor número de sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje a través de los axones de las fibras paralelas (Burgoyne y Cambray-Dekin, 1988). Durante este proceso ocurre una eliminación masiva de neuronas mediada por un proceso de muerte programada apoptótica que sirve para igualar el número de inervaciones y de células blanco, eliminando conexiones aberrantes. Se calcula que al final de la tercera semana de desarrollo se ha eliminado cerca del 50% de las neuronas granulares generadas durante la etapa proliferativa.

Cuando las NGC se cultivan de ratas de 8 días postnatales, las condiciones de alto potasio (≥ 20 mM) extracelular o el efecto de agonistas de los receptores glutamatérgicos como el NMDA aseguran su adecuado desarrollo y prolongan su sobrevivencia (Gallo *et al*, 1987 y Morán y Patel, 1989). Se cree que la despolarización inducida por las altas concentraciones de potasio o la presencia de NMDA en el medio mimetizan la inervación glutamatérgica de las fibras musgosas que reciben las NGC *in Vivo*. Por otro lado, cuando las NGC se cultivan en potasio 25 mM (K25) por 6-8 días *in Vitro* (DIV) y después se transfieren a un medio con potasio fisiológico (5 mM, K5), la mayoría de las células mueren en 24-48 horas mostrando características apoptóticas, incluyendo la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosomal del DNA y la activación de caspasas (D'Mello *et al*, 1993, Caballero-Benítez y Morán, 2003). La muerte producida por condiciones de bajo potasio en NGC puede ser disminuida por inhibidores de caspasas (Caballero-Benítez y Morán, 2003), antioxidantes (Schulz *et al*, 1996, Valencia y Morán, 2001), agonistas de receptores glutamatérgicos como el NMDA (Alavez *et al*, 2003) y por agentes que aumentan la concentración de AMPc intracelular

(Morán *et al*, 1999). Se ha sugerido que la muerte por privación de potasio esté mediada por la liberación del citocromo-c de la mitocondria y la activación de la caspasa-9, lo que induciría la activación de las caspasas-8 y 3 (Caballero-Benítez y Morán, 2003).

Las NGCs también mueren por otros estímulos, como la estaurosporina, un inhibidor de proteín cinasas que es un potente inductor de muerte apoptótica. Caballero-Benítez y Morán (2003) encontraron que en este modelo la muerte apoptótica por este estímulo activa la caspasa-2, la cual tendría un papel iniciador en la cascada de caspasas activando a las caspasas-9 y 3. También reportan una actividad basal de la caspasa-8 en los controles sin observar ninguna señal de muerte, lo que sugiere un mecanismo de control para la acción de esta caspasa como las IAPs endógenas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la importancia que tiene Smac/DIABLO en la regulación de la muerte, falta información sobre el papel que tienen las proteínas reguladoras de las IAPs en la muerte apoptótica, tanto en condiciones que promueven la sobrevivencia como en situaciones que inducen muerte de neuronas granulares del cerebelo. Por esto, resulta fundamental conocer la participación de Smac/DIABLO, una de estas moléculas, en este modelo.

HIPÓTESIS

Dada la importancia que tiene la modulación de la apoptosis en la eliminación de células durante el desarrollo, es posible que Smac/DIABLO esté presente en las NGC durante un periodo crítico de eliminación neuronal. Así, esperamos que en condiciones de sobrevivencia (alto potasio) Smac/DIABLO no promoverá muerte, mientras que lo hará en condiciones que favorezcan muerte apoptótica (bajo potasio crónico, cambio a bajo potasio, estaurosporina), por lo que se espera observar un aumento en la muerte al tratar las células con un inductor de apoptosis y el péptido con el motivo de unión a IAPs de Smac.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de Smac/DIABLO en NGC y conocer si tiene algún papel en situaciones que inducen muerte en este modelo (bajo potasio crónico, cambio a bajo potasio o estaurosporina).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la presencia de la proteína de Smac/DIABLO en lisados totales de NGC en condiciones que promueven supervivencia (alto potasio) y muerte (bajo potasio crónico, cambio a bajo potasio y estaurosporina) y estudiar sus posibles cambios en expresión.

Evaluar si el péptido Smac-N7 influye en la viabilidad de NGC en cultivo sometidas a un estímulo apoptótico (bajo potasio crónico, cambio a bajo potasio y estaurosporina).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Las NGC se obtuvieron como se ha descrito previamente por Morán y Patel (1989). Las suspensiones disociadas del cerebelo de ratas de 8 días de nacidas se sembraron a una densidad de 300,000 células /cm² en cajas de plástico recubiertas previamente con poli-L-lisina (5 µg/mL). Las células utilizadas para condensación nuclear se crecieron en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (25 µg/mL). El medio de cultivo utilizado contiene medio basal de Eagle suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (v/v), glutamina 2 mM, estreptomina 50 µg/ml, 50 U/ml de penicilina y KCl 25 mM (K25) o 5 mM (K5). Las cajas de cultivo se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ y 95% aire. Se añadió arabinósido de citosina (10 µM) después de 20 horas para evitar la proliferación de glia y fibroblastos. Para inducir muerte, las células se cultivaron desde el inicio en potasio fisiológico (K5 crónico) o se crecieron en K25 y a los 7 DIV (Días *In Vitro*) se transfirieron ya sea a un medio sin suero con KCl 5 mM (K5) o se trataron con estaurosporina 0.5 µM (STS).

Se utilizó el péptido Smac N7 (Calbiochem), el cual contiene los 7 aminoácidos N terminales de Smac unidos al homeodominio de Antennapedia para hacerlo permeable. El péptido se diluyó en DMSO a una concentración de 1.6 mM y se agregó al cultivo a 1 DIV en el caso de K25 y K5 crónico, al momento de inducir muerte con cambio a K5 o al poner el tratamiento con STS a distintas concentraciones entre 50 y 5 µM, o tres horas antes del tratamiento inductor de muerte en el caso de los experimentos de condensación nuclear. En algunos experimentos de los tratamientos crónicos (K25 y K5 crónico) el péptido se añadió también cada 3 días a la misma concentración.

La línea celular MCF-7 se utilizó como control positivo en los experimentos con el péptido Smac N7. Las células se cultivaron en medio DMEM con suero fetal bovino al 10%, se despegaron utilizando PBS-EDTA 1 mM-tripsina 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos con cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. Se trataron con STS 3 μM y/o con el péptido Smac N7 10 μM .

Viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada por el ensayo MTT (Mossman, 1983), El MTT se transforma a azul de formazán por las deshidrogenadas celulares activas, y la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables. El MTT (0.5 mg/mL) se añadió a los cultivos y las células se incubaron durante 15 min. a 37°C. Después de remover el medio, se añadió dimetil sulfóxido para extraer el azul de formazán. Después de incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, el azul de formazán se cuantificó espectrofotométricamente. El resultado se determinó como la absorbancia a 570 nm.

Condensación nuclear

Las células se fijaron al terminar el tratamiento con formaldehído al 4% en PBS por 30 min a 37°C, se lavaron con PBS y se incubaron con Hoechst 33258 (Molecular Probes) al 0.01% en PBS por 5 min protegidas de la luz. Se lavaron con PBS y se montaron utilizando glicerol:PBS 9:1. Se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon) utilizando un filtro UV-2A con filtro de excitación de 330-380 nm y filtro de barrera de 420 nm. Se contaron dos campos por preparación que contenían aproximadamente 400 células, utilizando un objetivo de 20X y se promediaron para el análisis estadístico. Se contaron como condensados aquellos

núcleos que tenían menor tamaño y que mostraban una mayor intensidad de fluorescencia que los controles.

Inmunoblots

Los cultivos se lavaron con PBS a 37°C, se homogenizaron y sonicaron en buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2%, pH 7.4) a 4°C, se sonicaron, centrifugaron y se trabajó con el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizaron 50 µg de proteína, los homogenados se corrieron bajo condiciones reductoras en un gel de SDS-PAGE al 20% a 4°C y se transfirieron a membranas de PVDF a 100 mA por gel toda la noche. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en amortiguador Tris-salino (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) por toda la noche y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C (anti-Smac/DIABLO, Calbiochem Cat. No. 567365 a una concentración de 1 µg/mL). Después de lavarse con TTBS (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1%, pH 7.5), las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA, Cat. A 3687 a una dilución 1:60,000) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron y se procesaron para visualizarse utilizando el sistema de quimioluminiscencia de acuerdo a las especificaciones del distribuidor (New England BioLabs) y expuestas a placas Kodak X-OMAT K. Para la densitometría se utilizó el programa Image J (National Institute of Health, USA). Las membranas se tiñeron con negro de amido y se utilizó una banda como control de carga.

Análisis Estadístico

Para las densitometrías de los Inmunoblots, se utilizó una prueba de t independiente de dos poblaciones.

RESULTADOS

Efecto de K5 y STS en la muerte de NGC

Las NGC se mantienen y diferencian *in Vitro* cuando se cultivan en condiciones despolarizantes de potasio (25 mM, K25). Por otro lado, mueren con características apoptóticas por alguna de las siguientes razones (entre otras): cuando se cultivan crónicamente en condiciones no despolarizantes de potasio (5 mM, K5), cuando después de 6-8 días en K25 el medio se cambia por uno no despolarizante de potasio (K5), o cuando se tratan con estaurosporina 0.5 μ M (STS). En la figura 4 se puede observar el efecto del tratamiento con K5 crónico, cambio a K5 y STS sobre la morfología de las NGC. Las células se cultivaron en un medio con KCl 25 mM ó 5 mM (K25 y K5 respectivamente) y después de 7 DIV, las células crecidas en K25 se trataron con STS ó con un medio sin suero conteniendo K5 en lugar de K25. A los 7 DIV se puede observar un menor número de células cuando se cultivan crónicamente con K5 (K5) a comparación de las cultivadas crónicamente con K25 (K25), además de que los procesos celulares se ven delgados y destruidos, característicos de la muerte en estas condiciones. Las células privadas de suero y potasio por 24 horas (K5 24 h) muestran somas condensados y procesos delgados y degradados indicativos de un proceso de muerte, así como las tratadas con STS por 24 hrs. (STS 24 h) que además de mostrar somas condensados, muestran una mayor degradación en los procesos. Se sabe que a este tiempo ha disminuido la viabilidad al 50% aproximadamente con ambos tratamientos (Caballero-Benítez y Morán, 2003). A las 6 h de tratamiento no se observaron cambios aparentes con ninguno de los tratamientos descritos (Fig. 4).

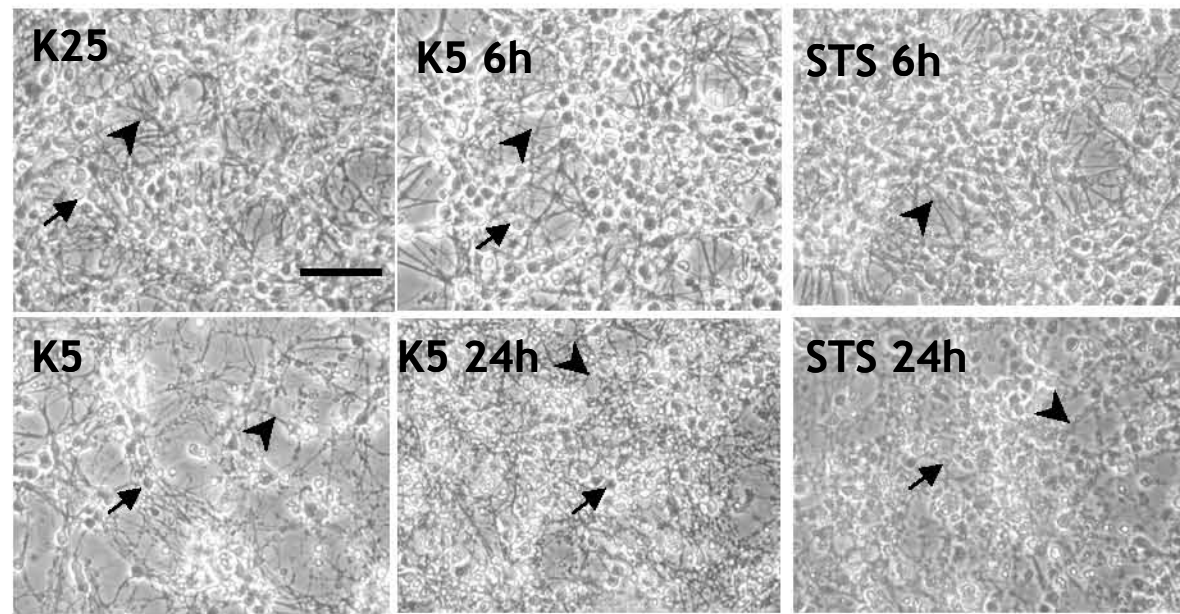


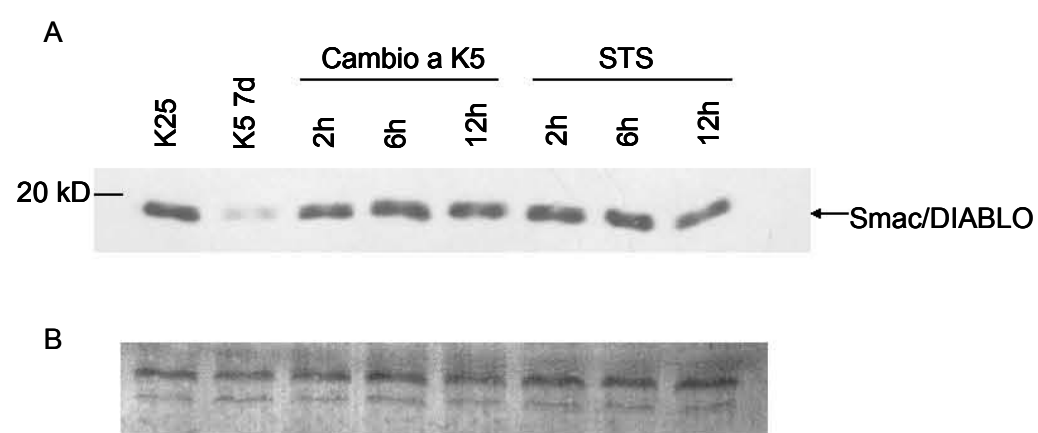
Figura 4. Efecto del tratamiento de muerte (K5 y STS) sobre la morfología de NGC. En la figura se pueden observar células crecidas por 7 DIV en condiciones despolarizantes (K25), en condiciones no despolarizantes (K5), crecidas por 7 DIV en condiciones despolarizantes y tratadas, ya sea con cambio de medio a K5, o con estaurosporina 0.5 μ M por 6 o 24 horas (K5 6 h, K5 24h, STS 6h y STS 24h respectivamente). Las flechas señalan los somas y las cabezas de flecha los procesos de las células. En K25, K5 6h y STS 6h se pueden ver somas turgentes y procesos fuertes. En K5, K5 24h y STS 24h, los somas están condensados y los procesos delgados y degradados. La barra equivale a 50 μ m.

Expresión de la proteína Smac/DIABLO en NGC

Para evaluar si la proteína Smac/DIABLO se expresaba en NGC y si existía algún cambio en su expresión en tratamientos inductores de muerte, se realizaron inmunoblots utilizando un anticuerpo anti-Smac/DIABLO (222-237) marca Calbiochem, el cual reconoce los aminoácidos 222-237 de Smac/DIABLO murina en la parte carboxilo terminal. Este anticuerpo reconoce también Smac de rata y al estar dirigido a la parte carboxilo, reconoce todas las formas de expresión alternativa de Smac. Se utilizaron NGC crecidas durante 7 DIV con K25 o K5 y tratadas con cambio a K5 o STS después de 7 DIV con K25. Para los tratamientos de

muerte se escogieron los siguientes tiempos: 2, 6 y 12 horas. A las dos horas se sabe que tanto en el cambio a bajo potasio como en el tratamiento con STS aún no se ve actividad de caspasas (Caballero-Benítez y Morán, 2003). Además, en el cambio a bajo potasio es un tiempo anterior al compromiso de muerte (que se da alrededor de las 3 horas), es decir el tiempo a partir del cual las células ya no pueden ser rescatadas reestableciendo el medio a K25 (Valencia y Morán, 2001). Dado que Caballero-Benítez y Morán (2003) reportan que a las 6 horas ya se ve activación de caspasas en ambos tratamientos además de que el citocromo c ya se encuentra en el citosol, se utilizaron 12 horas de tratamiento como un tiempo en el cual ya se alcanzaron los máximos de activación de caspasas en ambos modelos y en el cual la poza mitocondrial del citocromo c ya se encuentra liberada al máximo.

La figura 5 A muestra un Western Blot representativo y la figura 5 C muestra la densitometría y el análisis estadístico realizados (n=4).



C

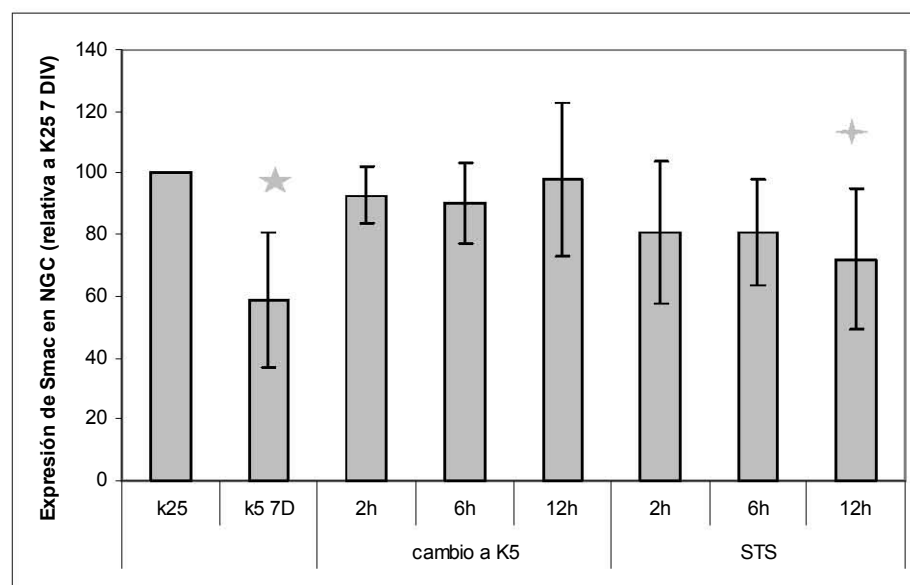


Figura 5. Inmunoblot anti-Smac/DIABLO. La figura 5 A muestra un inmunoblot representativo con los siguientes tratamientos: control (K25), células crecidas en medio con bajo potasio por 7 días (K5 7d), cambio a bajo potasio a los 7 DIV (cambio a K5) por 2, 6 y 12 hrs y tratamiento con estaurosporina (STS) por 2, 6 y 12 hrs. La figura 5 B muestra la membrana teñida con negro de amido y la figura 5 C muestra la densitometría realizada a los Inmunoblots (★ estadísticamente significativo con relación a K25 $p=0.01$, ✦ $p=0.05$, $n=4$; se graficó promedio \pm desviación estándar; prueba t de student).

La proteína Smac/DIABLO se encontró en todas las condiciones estudiadas. Las células crecidas crónicamente en bajo potasio (K5 7d) muestran una marcada reducción en los niveles de Smac/DIABLO probablemente debida al grado de maduración bioquímica que presentan estas neuronas bajo estas condiciones de cultivo. Se sabe que las neuronas crecidas en K25 presentan mayor actividad de

glutaminasa y de aspartato aminotransferasa, las enzimas involucradas en la síntesis del neurotransmisor de las NGC, en relación a las crecidas en K5, lo que podría ser indicativo de que las NGC necesitan estar despolarizadas para su maduración en cultivo (Caballero-Benítez *et al*, 2004). Por lo tanto, el cambio en los niveles de Smac a los 7 DIV podría ser indicativo del distinto grado de maduración neuronal o a la posible degradación de la proteína por el proteasoma después de su liberación.

El cambio a K5 no indujo ningún cambio en los niveles de la proteína hasta las 12 horas, donde se sabe que han muerto alrededor del 25% de las neuronas (Caballero-Benítez y Morán, 2003). En cambio, el tratamiento con STS indujo una disminución en los niveles de la proteína a las 12 horas de tratamiento, cuando han muerto cerca del 45% de las células, lo que podría ser indicativo de su degradación por el proteasoma una vez que ésta ha sido liberada al citoplasma. Sin embargo, para asegurar si Smac está o no promoviendo muerte en alguna de las condiciones anteriores, habría que evaluar su relocalización al citoplasma después del estímulo apoptótico.

Experimentos con el péptido N7

Para evaluar el posible papel de Smac/DIABLO en la muerte de NGC, se utilizó un péptido con los 7 residuos N terminales de Smac madura (AVPIAQK) ligado a un péptido de 16 residuos de aminoácido del homeodominio de Antennapedia para hacerlo permeable. Se ha demostrado que este péptido promueve la aparición de características apoptóticas al comportarse de forma similar a la forma citosólica de Smac/DIABLO promoviendo la activación de la procaspasa-3 *in vitro* (Chai *et al*, 2000) y aumentando la actividad de caspasas y la condensación nuclear en líneas celulares tratadas con agentes quimioterapéuticos (Arnt *et al*, 2002).

A. Viabilidad

Para evaluar si el tratamiento con el péptido N7 tenía efecto sobre la viabilidad de NGC, las células se trataron con el péptido y/o los distintos tratamientos inductores de muerte (bajo potasio crónico, cambio a K5 y STS). Después del tratamiento se realizó un ensayo de MTT que se utiliza como índice de viabilidad celular por medir la actividad de las deshidrogenasas celulares.

Las células crecidas en condiciones despolarizantes (K25) tratadas con el péptido a distintas concentraciones (5, 10 y 20 μM) no mostraron ninguna diferencia al compararlas con los controles hasta los 15 DIV. Las células crecidas en bajo potasio crónico aparentemente tampoco mostraron diferencia al tratarse con el péptido (Fig 6A). Se realizó un MTT a los 6 DIV para las células crecidas en K25 (Fig 6B) y no se observó diferencia entre el control y las tres concentraciones de péptido. En el MTT para las células crecidas en bajo potasio crónico (Fig 6C), no se observaron diferencias con los controles a las concentraciones de N7 de 10 y 20 μM , lo cual sugeriría que el péptido no tiene efecto en las células crecidas en estas condiciones. Sin embargo, contrario a lo esperado, en las células tratadas con el péptido 5 μM se observó un aumento con respecto al control ($p=0.05$, $n=3$). Una posible explicación para esta observación es que la actividad de caspasas podría favorecer la sobrevivencia o la maduración de las células crecidas en estas condiciones, lo cual ya ha sido reportado para otros modelos donde se ha mostrado que las caspasas están involucradas en la diferenciación de mioblastos, keratinocitos, precursores de monocitos-macrófagos y la activación de células T (Los, 2001). A concentraciones más altas, el péptido podría estar interactuando con IAPs que tienen otras funciones además de la inhibición de caspasas, como c-IAP2 que se ha implicado en la activación de Nf-kB (Chu *et al.*, 1997) o como survivina, que tiene un papel importante en la regulación de la mitosis (Rosa *et al.*, 2006), y por lo tanto, contrarestando la posible acción protectora de las caspasas en estas

condiciones. También, al aumentar la concentración del péptido, éste podría estar interfiriendo con las funciones de XIAP distintas a la inhibición de caspasas, como su participación en la vía de las MAP cinasas (Nachmias *et al*, 2004), o podría estar siendo degradado por el proteasoma al alcanzar cierto umbral de concentración intracelular.

También se utilizó el péptido N7 con estímulos inductores de muerte como cambio a bajo potasio. No se observaron diferencias en la morfología de los cultivos tratados con cambio a bajo potasio y los que además se trataron con péptido N7 10, 15 y 50 μM hasta las 24 horas después del cambio de medio. En la figura 7A se muestran fotos representativas. Tampoco se observaron diferencias en la viabilidad medida por MTT entre los controles y las células tratadas con el péptido a las concentraciones de 15 y 50 μM a las 8 horas (Figura 7B), tiempo en el cual se da el máximo de actividad de las caspasas-3 y 9 en las células con cambio a bajo potasio (Caballero-Benítez y Morán, 2003). Si el péptido hubiera tenido algún efecto promoviendo la activación de caspasas, este máximo se hubiera adelantado y a este tiempo esperaríamos observar algún cambio en la viabilidad de las células.

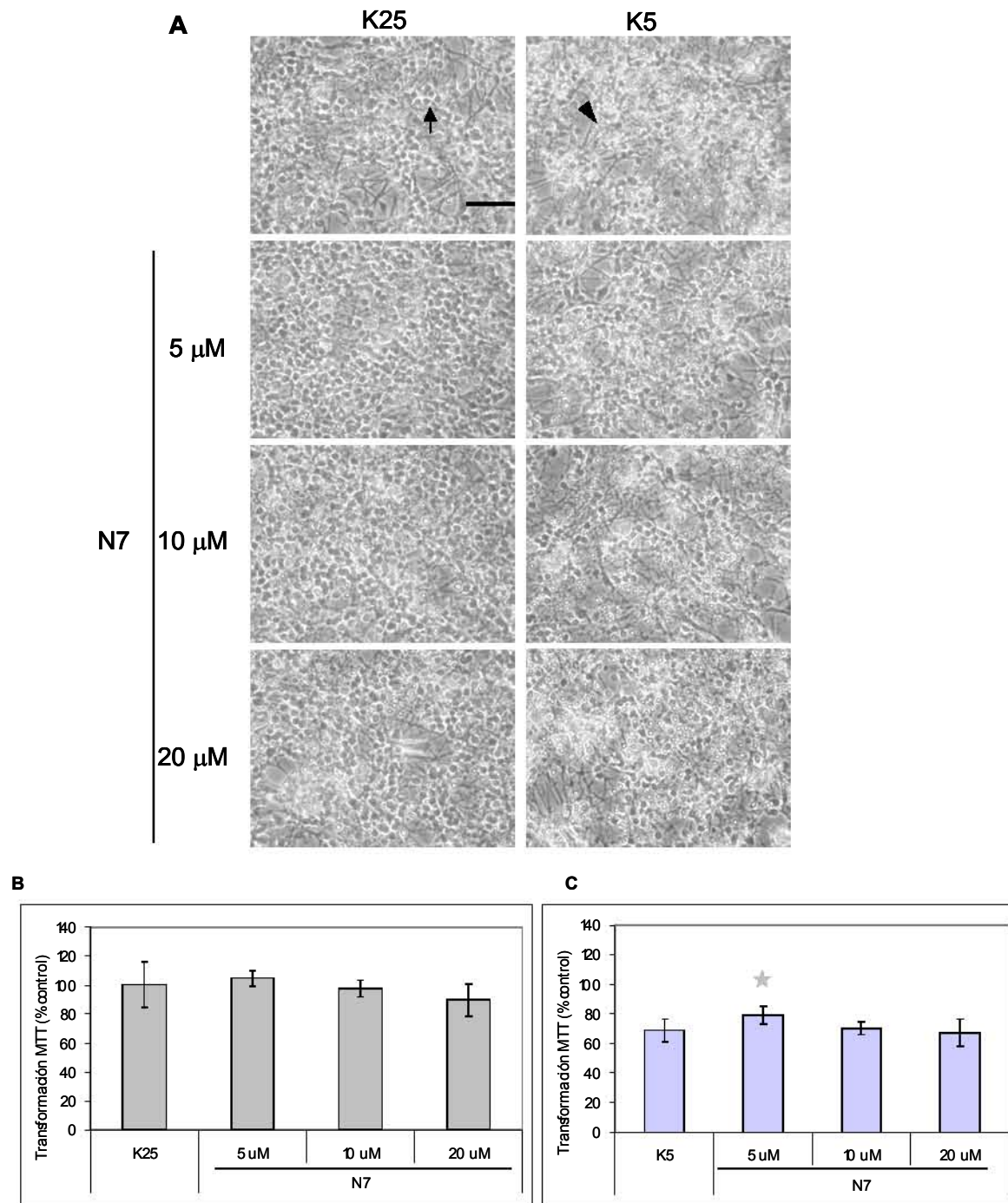


Figura 6. Tratamiento con péptido N7 en controles y tratamiento con bajo potasio crónico.

(A) Las células se incubaron con el péptido N7 a diferentes concentraciones un día después de ser cultivadas y se muestran las fotografías a los 6 DIV. La flecha muestra una célula sana y la cabeza de flecha una célula en proceso de muerte. La barra equivale a 50 μ m. B) MTT para NGC crecidas crónicamente en K25 y con péptido N7 5, 10 y 20 μ M (se utilizaron los datos de 4 muestras de 2

cultivos diferentes). (C) MTT para NGC crecidas en bajo potasio y con péptido N7 5, 10 y 20 μM (★ = estadísticamente significativo con respecto a K5, $p=0.05$, $n=3$; se graficó promedio \pm desviación estándar; prueba t de student)

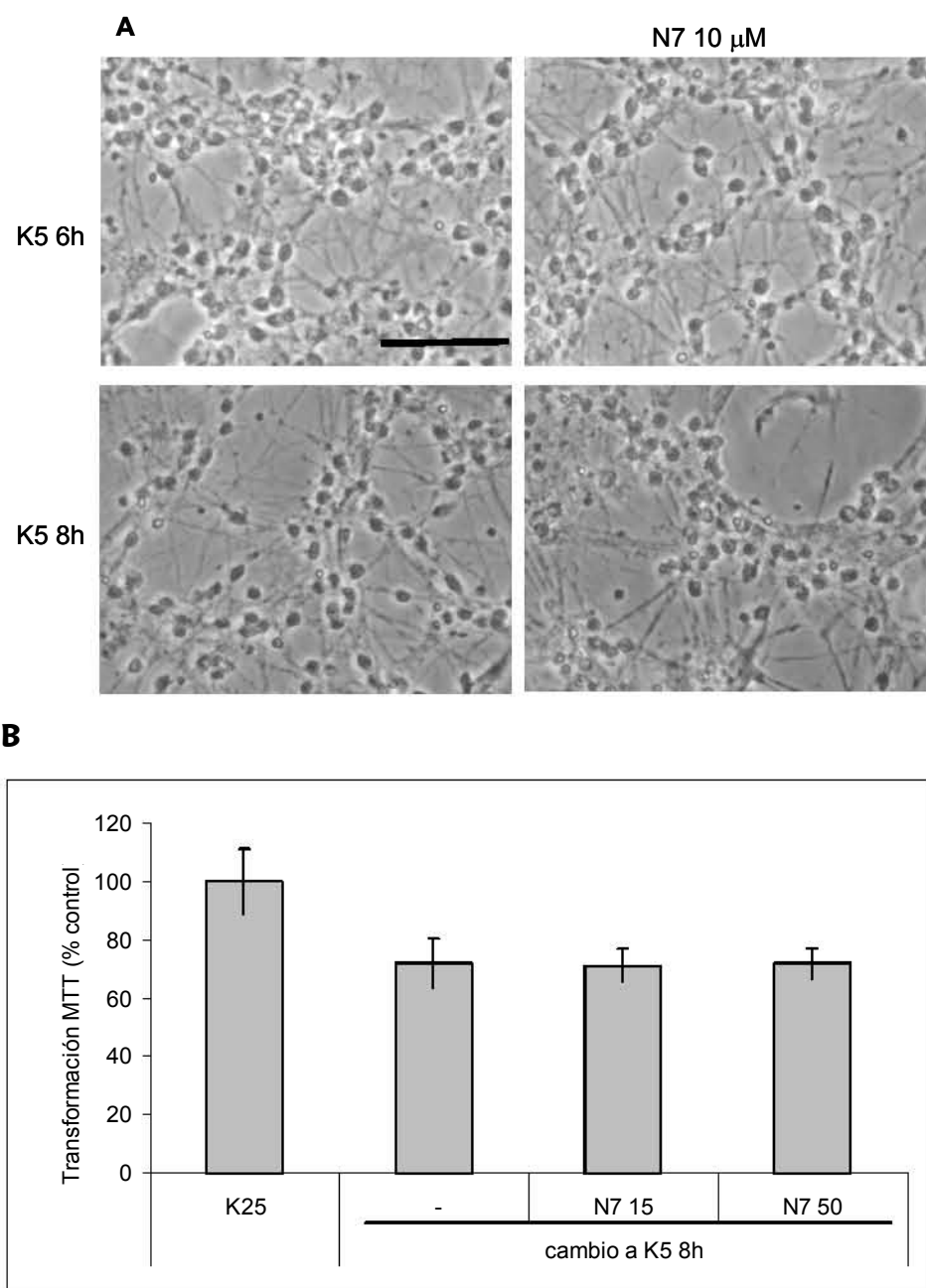


Figura 7. Efecto del péptido N7 de Smac sobre NGC tratadas a los 7 DIV con cambio a bajo potasio. (A) Las fotos muestran los cultivos tratados con cambio a bajo potasio (K5) y/o péptido Smac N7 10 μM a las 6 y 8 horas. La barra equivale a 50 μm . (B) La viabilidad de las células se midió utilizando el ensayo de MTT a las 8 horas después del tratamiento con cambio a bajo potasio y/o

tratamiento con N7 15 y 50 μM (los datos pertenecen a 4 muestras de 2 cultivos diferentes; se graficó promedio \pm desviación estándar; prueba t de student)

Las células también se trataron con STS 0.5 μM a los 7 DIV, se observaron hasta las 48 horas después del tratamiento y no se observó efecto del péptido sobre la morfología de las células. En la figura 8A se muestran fotos representativas. Tampoco se pudo observar diferencia entre los tratamientos en el ensayo de MTT a las 48 horas del tratamiento con STS y con el péptido 10 y 20 μM (Figura 8B).

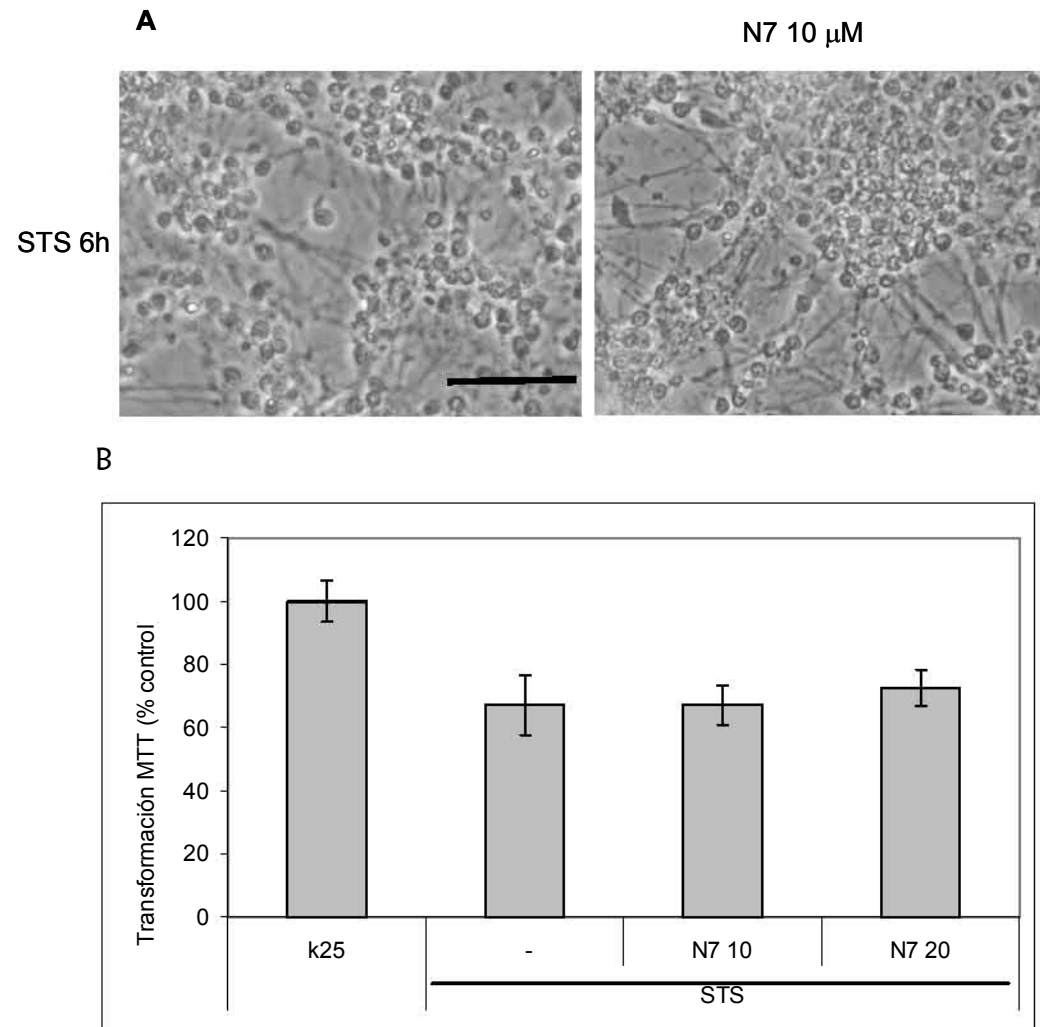


Figura 8. Efecto del péptido N7 de Smac sobre NGC tratadas a los 7 DIV con STS. (A) Las fotos muestran los cultivos tratados con STS y/o péptido Smac N7 10 μM a las 6 horas. La barra equivale a 50 μm . (B) La viabilidad de las células se midió por ensayo de MTT a las 48 horas después

del tratamiento con STS y/o tratamiento con N7 10 y 20 μM (se utilizaron 4 datos de 2 cultivos diferentes; se graficó promedio \pm desviación estándar; prueba t de student).

Como no se pudo observar disminución en la viabilidad ni alteraciones en la morfología de las células con tratamiento de muerte y péptido N7, se probó el péptido en líneas celulares en las que se sabe que induce condensación nuclear (Arnt *et al*, 2002).

B. Condensación Nuclear

Como control se utilizó la línea celular MCF-7 tratadas con STS 2 μM para confirmar que el péptido podía inducir condensación nuclear, ya que se sabe que Smac se trasloca de la mitocondria al citosol en estas condiciones a partir de las 2 horas (Rehm *et al*, 2003). Se realizaron ensayos de MTT para evaluar cambios en la viabilidad de las células MCF-7 preincubadas 3 horas con el péptido N7 y tratadas con STS 2 μM y/o el péptido N7 10 μM a distintos tiempos. No se pudieron observar diferencias en la viabilidad medida por MTT ni en la morfología de las células inducidas por el péptido (datos no mostrados).

Como no se observó ningún efecto del péptido N7 en la viabilidad medida por MTT en la línea celular tratada con STS, se evaluó si tenía algún efecto sobre la condensación nuclear. Las células se preincubaron 3 horas con péptido 10 μM , después del tratamiento se tiñeron con Hoechst y se contó el porcentaje de núcleos picnóticos y fragmentados. Se encontró una mayor condensación nuclear en las células tratadas con STS 3 μM y el péptido N7 a las 20 horas después del tratamiento (Figura 9).

Una posible explicación al aumento en el porcentaje de núcleos condensados sin que se observen cambios en la viabilidad, es que en esta línea celular que no

tiene caspasa-3 (Jänicke *et al.*, 1998), la principal caspasa efectora que se activaría después del tratamiento con el péptido sería la caspasa-7. Se sabe que la caspasa-7 tiene sustratos nucleares como PARP (Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa) y que está presente en el núcleo celular (Germain *et al.*, 1999). Probablemente esta caspasa esté más implicada en determinar la morfología celular después de un estímulo apoptótico que en la muerte celular. Sin embargo, no se puede descartar que no se haya medido la viabilidad en el momento adecuado en el que se pudiera detectar el cambio, o que la técnica de MTT no sea lo suficientemente sensible para detectarlo.

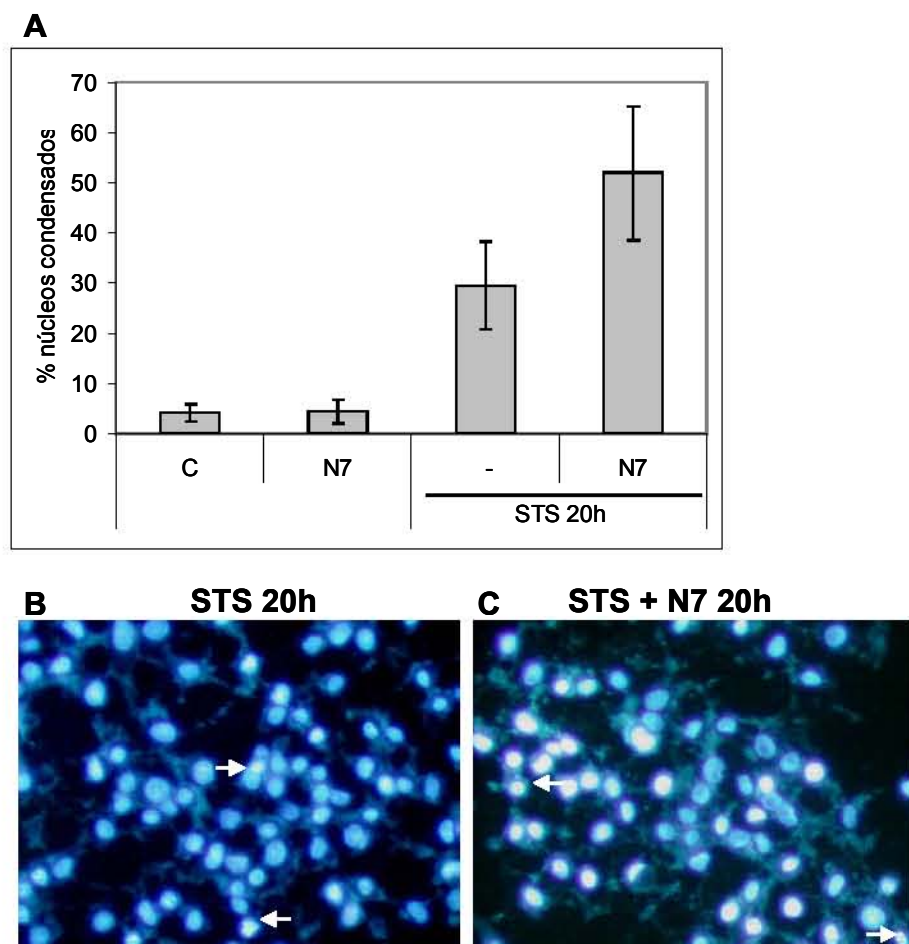


Figura 9. Efecto del péptido N7 en la condensación nuclear de células MCF-7 tratadas con STS. (A) Porcentaje de núcleos condensados evaluados por tinción de Hoechst de células MCF-7 preincubadas con péptido N7 y tratadas con STS y péptido N7 por 20 horas (los valores corresponden a 4 datos de 2 experimentos diferentes; se graficó promedio \pm desviación estándar).

Fotos representativas de células tratadas con STS (B) y STS + péptido N7 (C). Las flechas blancas señalan núcleos condensados.

Para evaluar si el péptido N7 sí tenía efecto sobre la condensación nuclear que se observa en NGC, las células se crecieron en cubreobjetos, se preincubaron 3 horas con N7 10 μM y después se trataron ya sea con cambio a K5 o con STS 0.5 μM . En la figura 10 se observa el conteo de los núcleos condensados a las 8 horas y no se observó diferencia entre las células tratadas con cambio a K5 o STS y las tratadas con el péptido. También se hicieron conteos a las 6, 7 y 12 horas y no se observaron diferencias (datos no mostrados). Por lo tanto, no se encontró efecto del péptido N7 sobre la condensación nuclear inducida por cambio a bajo potasio o STS en NGC.

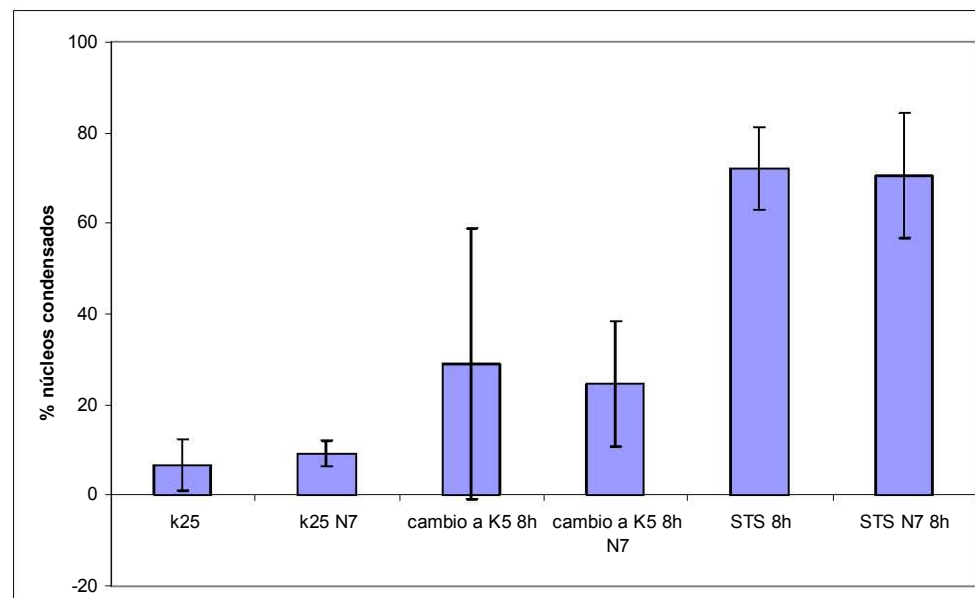


Figura 10. Efecto del péptido N7 sobre la condensación nuclear de NGC tratadas con cambio a K5 y STS. La gráfica muestra el porcentaje de núcleos condensados de NGC preincubadas con N7 10 μM por 3 horas y tratadas con cambio a K5 (K5 8h) y STS por 8 horas (STS 8h, se muestran los datos correspondientes a 4 muestras de 2 cultivos diferentes).

DISCUSIÓN

El cultivo de neuronas granulares de cerebelo es un modelo ampliamente utilizado para estudiar apoptosis. A pesar de que se conocen muchos de los procesos que llevan a la muerte de estas neuronas, en este modelo se desconoce el papel de las moléculas reguladoras de las IAPs, como Smac/DIABLO. Du *et al* y Verhagen *et al* (2000) no observaron el RNA mensajero de Smac en cerebro murino. Sin embargo, en este trabajo se encontró que la proteína de Smac está presente en neuronas granulares de cerebelo en cultivo tanto en condiciones de sobrevivencia (K25) como en condiciones que inducen muerte (K5 crónico, cambio a bajo potasio y estaurosporina).

Se observó una disminución en los niveles de la proteína de Smac en las células crecidas crónicamente en bajo potasio. Esta disminución puede deberse al menor grado de maduración bioquímica que presentan las células en estas condiciones de cultivo. Se sabe que las caspasas podrían estar implicadas en procesos de diferenciación y división celular. De hecho, los ratones caspasa-3 *-/-* nacen con menor frecuencia y son más pequeños que los silvestres y los ratones caspasa-8 *-/-* no desarrollan adecuadamente el corazón y las células precursoras hematopoyéticas muestran una disminución en su capacidad de formación de colonias (Los *et al*, 2001). Además, se sabe que las neuronas granulares de cerebelo presentan actividad de caspasa-8 cuando se cultivan en medio despolarizante sin exponerse a ningún estímulo apoptótico (Caballero-Benítez A y Morán J, 2003), lo cual podría ser necesario para su sobrevivencia. Por lo tanto, una menor cantidad de la proteína total de Smac disponible para salir al citosol y provocar la activación de caspasas podría estar evitando el papel de las caspasas en la diferenciación de estas células. Otro resultado que apoya esta idea es el aumento en la viabilidad que se observó al tratar las células crecidas en bajo potasio con el péptido que corresponde al fragmento N-terminal de Smac madura (N7) 5 μ M. Actualmente, en el laboratorio

se estudia el posible papel de las caspasas en el desarrollo de las NGC en cultivo. Sería interesante estudiar los niveles de la proteína de Smac en células crecidas crónicamente en bajo potasio en etapas más tempranas a los 7 días y medir la actividad de caspasas en células tratadas con el péptido.

Otra posible explicación para esta disminución en los niveles totales de Smac puede ser que la proteína ya haya sido liberada al citoplasma y degradada por el proteasoma en estas etapas del proceso de muerte, ya que se sabe que en NGC existen niveles importantes de las IAPs (Blancas y Morán, en preparación) que podrían estar provocando la degradación de Smac en el citoplasma.

El cambio a K5 no indujo ningún cambio en los niveles de la proteína. Es importante mencionar que esto no es indicativo de que Smac no esté participando en los procesos de muerte; faltaría evaluar si la proteína se está liberando al citosol donde podría inhibir la acción protectora de las IAPs por medio de un fraccionamiento celular o una inmunohistoquímica. Por otro lado, el tratamiento con el péptido Smac N7 junto con el cambio a bajo potasio no tuvo efecto sobre la viabilidad ni sobre la condensación nuclear a ninguna de las concentraciones utilizadas, lo que parece indicar que Smac no participa en el proceso de muerte inducido por cambio a bajo potasio en NGC. Faltaría evaluar la actividad de caspasas en células tratadas con el péptido.

El tratamiento con STS indujo una disminución del 30% en los niveles de la proteína a las 12 horas de tratamiento, esta disminución podría deberse a la degradación de la proteína una vez que ésta ha sido liberada al citoplasma o a una disminución en la síntesis de la proteína independiente del proceso de muerte. Sin embargo, el tratamiento con el péptido N7 junto con STS no influyó en la viabilidad ni en la condensación nuclear de las células, lo que sugeriría que si Smac

está siendo liberada al citosol su extremo amino terminal no está teniendo efecto alguno en el proceso de muerte inducida por STS.

Las células crecidas en condiciones despolarizantes (K25) no mostraron diferencias en viabilidad al ser tratadas con el péptido N7, lo que concuerda con lo esperado ya que sólo se espera que Smac induzca muerte después de un estímulo que lleve a la activación de caspasas y a su inhibición por IAPs.

Por último, la línea celular MCF-7 se utilizó como control positivo para los experimentos del péptido N7. Aunque no se pudieron observar cambios en la morfología de las células ni en la viabilidad medida por MTT de células tratadas con STS y con el péptido, sí se observó un aumento en el porcentaje de núcleos condensados en las células tratadas con STS y el péptido N7 a las 20 horas. Probablemente en esta línea celular, al no tener caspasa-3, la caspasa-7 funcione como la principal caspasa efectora en respuesta al tratamiento con el péptido. Se sabe que esta caspasa tiene sustratos nucleares (Germain *et al*, 1999) por lo que podría estar induciendo condensación nuclear y no un cambio detectable en la viabilidad.

CONCLUSIONES

- Smac/DIABLO está presente en neuronas granulares de cerebelo en cultivo, pero no existe una relación aparente entre los niveles de la proteína y los procesos de muerte inducidos por cambio a bajo potasio y STS.
- Los resultados obtenidos con el péptido N7 sugieren que el dominio de unión a IAPs del fragmento procesado de Smac no es importante en la muerte de NGC inducida por estos estímulos. Probablemente XIAP tampoco esté inhibiendo de manera importante a la caspasa-9 en este modelo. A pesar de que no se demostró que Smac se liberara en NGC en respuesta a los

estímulos utilizados, los resultados con el péptido sugieren que si la proteína se libera, ésta no está teniendo ningún efecto en el proceso de muerte inducida por cambio a bajo potasio o estaurosporina.

- Es posible que Smac participe en otros procesos asociados al desarrollo de NGC o regulando la actividad de las caspasas implicadas en los procesos de desarrollo y/o diferenciación.

REFERENCIAS

- Alavez S, Pedroza D, Morán J. Mechanisms of Cell Death by Deprivation of Depolarizing Conditions During Cerebellar Granule Neurons Maturation. *Neurochem Int.* 2003, 43(6): 581-590.
- Arnt C, Chiorean M, Heldebrant M, Gores G, Kaufmann S. Synthetic Smac/DIABLO Peptides Enhance the Effects of Chemotherapeutic Agents by Binding XIAP and cIAP1 *in Situ*. *J Biol Chem.* 2002, 277: 44236-44243.
- Bartke T, Pohl C, Pyrowolakis G, Jentsch S. Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell.* 2004, 14: 801-811.
- Boatright K, Renatus M, Scott F, Sperandio S, Shin H, Pedersen I, Ricci J, Edris W, Sutherlin D, Green D, Salvesen G. A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Mol Cell.* 2003, 11: 529-541.
- Bradford M. A rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- Burgoyne R, Cambray-Deakin M. The Cellular Neurobiology of Neuronal Development: the Cerebellar Granule Cell. *Brain Res Rev.* 1988, 13: 77-101.
- Burri L, Strahm Y, Hawkins C, Gentle I, Puryer M, Verhagen A, Callus B, Vaux D, Lithgow T. Mature DIABLO/Smac is Produced by the IMP Protease Complex on the Mitochondrial Inner Membrane. *Mol Biol of the Cell.* 2005, 16: 2926-2933.
- Caballero-Benítez A, Alavez S, Uribe R, Morán J. Regulation of Glutamate-Synthesizing Enzymes by NMDA and Potassium in Cerebellar Granule Cells. *Eur J Neurosci.* 2004, 19: 2030-2038.
- Caballero-Benítez A, Morán J. Mecanismos Moleculares de la Regulación de la Muerte Apoptótica. *REB.* 2002, 21: 235-244.
- Caballero-Benítez A, Morán J. Caspase Activation Pathways Induced by Staurosporine and Low Potassium: Role of Caspase-2. *J Neurosci Res.* 2003, 71: 383-396.
- Chai J, Du C, Wu J, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000, 406:855-862.
- Chu Z, McKinsey T, Liu L, Gentry M, Ballard D. Suppression of Tumor Necrosis Factor Induced Cell Death by Inhibitor of Apoptosis c-IAP2 is Under Nf-kB Control. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, 94: 10057-10062.
- D'Mello S, Galli C, Ciotti T, Calissano P. Induction of Apoptosis in Cerebellar Granule Neurons by Low Potassium: Inhibition of Death by Insulin-like Growth Factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci.* 1993, 90: 10989-10993.
- Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-Dependent Pathway is Required for TNF α -Induced Apoptosis. *Cell.* 2003, 115:61-70.

- Deveraux Q, Reed J. IAP Family Proteins – Suppressors of Apoptosis. *Genes Dev.* 1999, 13: 239-252.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell.* 2000, 102: 33-42.
- Fu J, Jin Y, Arend L. Smac3, a Novel Smac/DIABLO Splicing Variant, Attenuates the Stability and Apoptosis-Inhibiting Activity of XIAP. *J Biol Chem.* 2003, 278: 52660-52672.
- Gallo V, Kingsbury A, Balázs R, Jorgensen OS. The Role of Depolarization in the Survival and Differentiation of Cerebellar Granule Cells in Culture. *J Neurosci.* 1987, 7: 2203-2213.
- Gerhardt E, Kügler S, Leist M, Beier C, Berliocchi L, Volbracht C, Weller M, Bähr M, Nicotera P, Schulz J. Cascade of Caspase Activation in Potassium-Deprived Cerebellar Granule Neurons: Targets for Treatment with Peptide and Protein Inhibitors of Apoptosis. *Mol Cell Neurosci.* 2001, 17: 717-731.
- Germain M, Affar E, D'Amours D, Dixit V, Salvesen G, Poirier G. Cleavage of Automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase During Apoptosis. *J Biol Chem.* 1999, 274: 28379-28384.
- Hao Y, Sekine K, Kawabata A, Nakamura H, Ishioka T, Ohata H, Katayama R, Hashimoto C, Zhang X, Noda T, Tsuruo T, Naito M. Apollon Ubiquitinates SMAC and Caspase-9, and Has an Essential Cytoprotection Function. *Nat Cell Biol.* 2004, 6: 849-860.
- Hengartner M. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature.* 2000, 407: 770-776.
- Hu S, Yang X. Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 and 2 are Ubiquitin Ligases for the Apoptosis Inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem.* 2003, 278: 10055-10060.
- Jänicke R, Sprengart M, Wati M, Porter A. Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J Biol Chem.* 1998, 273: 9357-9360.
- Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 1972, 26: 239-257.
- Liston P, Gin Fong W, Kelly L, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Katsuyuki T, Craig C, McBurney M, Korneluk R. Identification of XAF1 as an Antagonist of XIAP Anti-Caspase Activity. *Nat Cell Biol.* 2001, 3: 128-133.
- Liu Z, Sun C, Olejniczak E, Meadows R, Betz S, Oost T, Herrmann J, Wu J, Fesik S. Structural Basis for Binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 Domain. *Nature.* 2000, 408: 1004-1008.
- Los M, Stroh C, Jänicke R, Engels I, Schulze-Osthoff K. Caspases: More Than Just Killers? *Trends in Immunol.* 2001, 22:31-34.
- Lotocki G, Alonso O, Frydel B, Dietrich W, Keane R. Monoubiquitination and Cellular Distribution of XIAP in Neurons After Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003, 23: 1129-1136.

- MacFarlane M, Merrison W, Bratton S, Cohen G. Proteasome-Mediated Degradation of Smac during Apoptosis: XIAP Promotes Smac Ubiquitination *in Vitro*. *J Biol Chem*. 2002, 277: 36611-36616.
- Moran J, Itoh T, Reddy U, Chen M, Alnemri E, Pleasure D. Caspase-3 Expression by Cerebellar Granule Neurons Is Regulated by Calcium and Cyclic AMP. *J Neurochem*. 1999, 73: 568-577.
- Morán J, Patel A. 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*. 1989, 46: 97-105.
- Mossman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*. 1983, 65: 55-63.
- Nachmias B, Ashhab Y, Yehuda D. The Inhibitor of Apoptosis Protein Family (IAPs) an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004, 14: 231-243.
- Oppenheim R. Cell Death During Development of the Nervous System. *Annu Rev Neurosci*. 1991, 14: 453-501.
- Rehm M, Dübmann H, Prehn J. Real-Time Single Cell Analysis of Smac/DIABLO Release During Apoptosis. *J Cell Biol*. 2003, 162: 1031-1043.
- Riedl S, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik S, Liddington R, Salvesen G. Structural Basis for the Inhibition of Caspase-3 by XIAP. *Cell*. 2001, 104: 791-800.
- Roberts D, Merrison W, MacFarlane M, Cohen G. The Inhibitor of Apoptosis Protein-binding Domain of Smac Is Not Essential for its Proapoptotic Activity. *J Cell Biol*. 2001, 153 (1): 221-227.
- Rosa J, Canovas P, Islam A, Altieri D, Doxsey S. Survivin Modulates Microtubule Dynamics and Nucleation Throughout the Cell Cycle. *Mol Biol Cell*. 2006, (on-line).
- Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. Interaction Between XIAP and Smac/DIABLO in the Mouse Brain After Transient Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003, 23: 1010-1019.
- Salvesen G, Duckett C. IAP Proteins: Blocking the Road to Death's Door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, 3: 401-410.
- Savill J, Fadok V. Corpse Clearance Defines the Meaning of Cell Death. *Nature*. 2000, 407: 784-788.
- Schulz J, Weller M, Klockgether T. Potassium Deprivation-Induced Apoptosis of Cerebellar Granule Neurons: A Sequential Requirement for New mRNA and Protein Synthesis, ICE-Like Protease Activity, and Reactive Oxygen Species. *J Neurosci*. 1996, 16: 4696-4706.
- Shi Y. A Structural View of Mitochondria-Mediated Apoptosis. *Nat Struct Biol*. 2001, 8: 394-401.

- Silke J, Kratina T, Ekert P, Pakusch M, Vaux D. Unlike Diablo/smac, Grim Promotes Global Ubiquitination and Specific Degradation of X Chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) and Neither Cause Apoptosis. *J Biol Chem.* 2004, 279: 4313-4321.
- Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, Liston P, Korneluk R, MacKenzie E, Bähr M, Klockgether T, Robertson G, Weller M, Schulz B. Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Inhibitors of Apoptosis Proteins Delays Apoptosis in Cerebellar Granule Neurons. *J Neurochem.* 1999, 72: 292-301.
- Singh R, Upadhyay G, Godbole M. Hypothyroidism Alters Mitochondrial Morphology and Induces Release of Apoptogenic Proteins During Rat Cerebellar Development. *J Endocrinol.* 2003, 176: 321-329.
- Srinivasula S, Datta P, Fan X, Fernandes T, Huang Z, Alnemri E. Molecular Determinants of the Caspase-promoting Activity of Smac/DIABLO and Its Role in the Death Receptor Pathway. *J Biol Chem.* 2000, 275: 36152-36157.
- Sun X, Bratton S, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen G. Bcl-2 and Bcl-xL Inhibit CD95-Mediated Apoptosis by Preventing Mitochondrial Release of Smac/DIABLO and Subsequent Inactivation of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein. *J Biol Chem.* 2002, 277: 11345-11351.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A Serine Protease, HtrA2, is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death. *Mol Cell.* 2001, 8: 613-621.
- Takasawa R, Tanuma S. Sustained Release of Smac/DIABLO from Mitochondria Commits to Undergo UVB-Induced Apoptosis. *Apoptosis.* 2003, 8: 291-299.
- Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science.* 1998, 281: 1312-1316.
- Thornberry N, Rano T, Peterson E, Rasper D, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager V, Nordstrom P, Roy S, Vaillancourt J, Chapman K, Nicholson D. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B. *J Biol Chem.* 1997, 272: 17907-17911.
- Thornburn A. Death Receptor-Induced Cell Killing. *Cell Signal.* 2004, 16: 139-144.
- Valencia A, Morán J. Role of Oxidative Stress in the Apoptotic Cell Death of Cultured Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci Res.* 2001, 64: 284-297.
- Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial Intermembrane Proteins in Cell Death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 304: 487-497.
- Verhagen A, Ekert P, Pakusch M, Silke J, Connolly L, Reid G, Moritz R, Simpson R, Vaux D. Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell.* 2000, 102: 43-53.

- Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, Pisabarro M, Kadkhodayan S, Fairbrother W, Dixit V. SMAC Negatively Regulates the Anti-apoptotic Activity of Melanoma Inhibitor of Apoptosis (ML-IAP). *J Biol Chem*. 2002, 277: 12275-12279.
- Wang V, Zoghbi H. Genetic Regulation of Cerebellar Development. *Nat Rev Neurosci* . 2001. 2: 484-91.
- Wu G, Chai J, Suber T, Wu J, Du C, Wang X, Shi Y. Structural Basis of IAP Recognition by Smac/DIABLO. *Nature*. 2000, 408: 1008-1012.
- Yang Q, Du C. Smac/DIABLO Selectively Reduces the Levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and Livin in HeLa Cells. *J Biol Chem*. 2004, 279: 16963-16970.
- Yoon K, Duk H, Lee Y. Direct Interaction of Smac with NADE Promotes TRAIL-induced Apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm*. 2004, 319:649-654.