



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PAPEL DE LAS MOLÉCULAS REGULADORAS DE  
APOPTOSIS EN LA SOBREVIVENCIA DE  
NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO EN  
CULTIVO Y EN EL DESARROLLO POSTNATAL  
DEL CEREBELO**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A  
M. EN C. SUGELA SUSANA BLANCAS ZUGARAZO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO MORAN ANDRADE**



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Julio Morán Andrade en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Julio Morán Andrade por su asesoría, tiempo e interés en el desarrollo de este trabajo y mi formación académica.

A mi comité tutoral, la Dra. Diana Escalante Alcalde y el Dr. Jorge Meléndez Zajgla, por su valiosa contribución a este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Gabriela Morali de La Brena, Dra. Vilma Maldonado Lagunas, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez y Dr. Julio Morán Andrade por la revisión y contribuciones a este trabajo.

A la Biól. Guadalupe Domínguez, por el apoyo técnico a la realización de este trabajo.

A la Unidad de Microscopía del IFC, particularmente al Biól. Gabriel Orozco y la Dra. Araceli Patrón.

A mi familia y amigos.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio.

Al Instituto de Fisiología Celular y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

*“El individuo ha luchado siempre  
para no ser absorbido por la tribu.  
Si lo intentas, a menudo estarás  
solo, y a veces asustado. Pero ningún  
precio es demasiado alto por el  
privilegio de ser uno mismo.”*

Friedrich Wilhelm Nietzsche  
(1844-1900)

*A mi madre por forjar los cimientos de lo que ahora soy*

*A Gustavo y a Raquel por estar presentes cuando los necesito*

*A mis amigas por ser quienes son*

*A todas las personas que han influido en mi vida, quizá  
sin saberlo, pero que de alguna manera la han transformado*

**ÍNDICE**

Resumen.....	3
Abstract.....	4
I. Introducción.....	6
1.1 Desarrollo del cerebelo.....	6
1.2 Muerte celular apoptótica.....	11
1.2.1 Las caspasas.....	12
1.2.2 Proteínas inhibidoras de apoptosis.....	14
1.2.3 IAPs en la sobrevivencia neuronal.....	22
1.2.4 Factor inductor de apoptosis.....	24
1.3 Muerte celular programada durante el desarrollo del cerebelo.....	25
II. Antecedentes.....	28
III. Hipótesis.....	31
IV. Objetivos.....	31
Objetivo generales.....	31
Objetivos particulares.....	31
V. Procedimiento experimental.....	32
5.1 Cultivos primarios de NGC.....	32
5.2 Viabilidad celular y translocación de fosfatidíserina.....	32
5.3 Inmunoblots.....	33
5.4 Actividad de caspasa-3 e inhibición de caspasas.....	34
5.5 Obtención de la fracción mitocondrial.....	35
5.6 Inmunofluorescencia.....	35
5.7 Inmunohistoquímica.....	36
5.8 Inmunoprecipitación.....	37
5.9 Análisis estadístico.....	38
VI. Resultados.....	39
6.1 Papel de AIF en la muerte apoptótica de neuronas cerebelares.....	39
6.1.1 Blancas, S. y Morán, J. (2011). Role for Apoptosis-Inducing Factor in the Physiological Death of Cerebellar Neurons. Neurochem Int., 58 (8): 934-942.....	45

6.2	Papel de las IAPs en la supervivencia de NGC y células cerebelares.....	46
6.2.1	Niveles de IAPs en el cerebelo durante el desarrollo postnatal.....	46
6.2.2	Localización de IAPs en la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal.....	47
6.2.3	Efecto de K5 y K25 crónico en la viabilidad de NGC en cultivo.....	53
6.2.4	Niveles de IAPs en NGC en condiciones de supervivencia inducida por despolarización con potasio.....	53
6.2.5	Efecto de K5 y K25 en la interacción XIAP/caspasa-3 activa.....	58
VII.	Discusión.....	60
7.1	Papel de AIF en la muerte apoptótica de neuronas cerebelares.....	61
7.2	Papel de las IAPs en la supervivencia de NGC y células cerebelares.....	64
VIII.	Conclusiones.....	68
IX.	Referencias.....	69



## RESUMEN

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada caracterizada por cambios morfológicos y bioquímicos, conducidos principalmente por las proteasas denominadas caspasas. Entre las moléculas reguladoras de apoptosis también se encuentra la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) y el factor inductor de apoptosis (AIF). Las IAPs son reguladores negativos de las caspasas y se sugiere que pueden modular la supervivencia neuronal promovida por agentes tróficos. Por su parte, AIF está implicado en la muerte apoptótica independiente de caspasas. El AIF liberado de la mitocondria se transloca al núcleo, donde regula eventos apoptóticos como la condensación y degradación del DNA. En este trabajo se estudió el papel de AIF y las IAPs en la muerte y/o supervivencia neuronal bajo condiciones fisiológicas. Cuando analizamos la localización celular de AIF durante el desarrollo cerebelar, encontramos un incremento significativo en el número de neuronas con localización nuclear de AIF de manera dependiente de edad. Por otro lado, las neuronas granulares de cerebelo (NGC) cultivadas crónicamente en concentraciones bajas de potasio (5 mM KCl; K5) mueren con características apoptóticas después de 5 días. En este estudio encontramos que K5 induce en las NGC una muerte apoptótica dependiente de caspasas, así como una translocación nuclear tardía de AIF. Cuando la muerte de NGC inducida por K5 se llevó a cabo en presencia de un inhibidor general de caspasas, hubo una ligera reducción de la muerte celular, pero las neuronas eventualmente murieron mostrando características apoptóticas, como translocación de fosfatidilserina y condensación nuclear. Adicionalmente, hubo un incremento significativo en la translocación nuclear de AIF. Por su parte, cuando analizamos los niveles de las IAPs durante el desarrollo del cerebelo, encontramos, de manera dependiente de la edad, un incremento de XIAP y una

disminución de cIAP2 y survivina. Por otro lado, encontramos que la muerte de las NGC inducida por K5 va acompañada por una disminución de los niveles de XIAP, mientras que concentraciones altas de potasio (25 mM KCl; K25), las cuales promueven la sobrevivencia de las NGC, mantienen altos niveles de XIAP. Además, encontramos en las NGC que la XIAP está interactuando con la caspasa-3, lo que inhibe a la caspasa y promueve sobrevivencia. En conjunto, los resultados apoyan la idea de que AIF puede estar involucrada en la muerte apoptótica de NGC y que este puede ser un mecanismo alternativo de muerte neuronal durante el desarrollo del cerebelo. Mientras que la XIAP parece estar involucrada en la sobrevivencia de NGC, promovida por condiciones tróficas.

## **ABSTRACT**

Apoptosis is a type of programmed cellular death characterized by morphological and biochemistry alterations, which are mainly carried out by proteases called caspases. This process can be regulated by the inhibitory apoptosis proteins (IAPs) and the apoptosis-inducing factor (AIF). IAPs negatively regulate caspases and it is suggested that IAPs could regulate neuronal survival. In contrast, AIF is implicated in caspase-independent apoptotic death. AIF released from the mitochondria translocates to the nucleus, where it mediates some apoptotic events such as chromatin condensation and DNA degradation. Here, we studied the role of AIF and the IAPs in the neuronal death and/or neuronal survival under physiological conditions. When we analyzed the cellular localization of AIF during cerebellar development, we found a significant increase in the number of neurons with nuclear AIF localization in an age-dependent manner. On the other hand, cerebellar granule neurons (CGN) chronically cultured in low concentration of

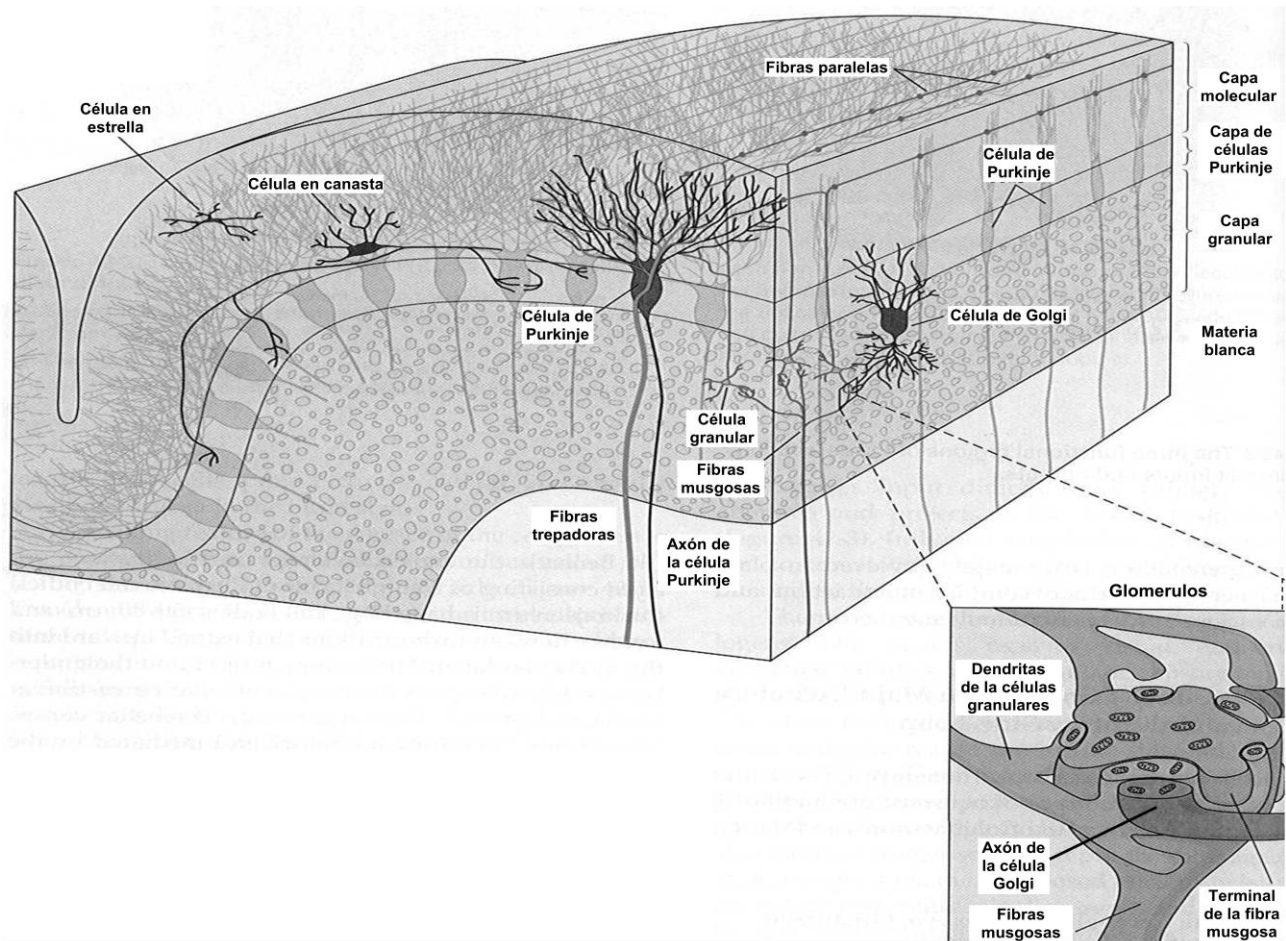
potassium (5 mM; K5) died with apoptotic-like characteristics after five days. In the present study we found that K5 induced a caspase-dependent apoptotic-like death of CGN as well as a late nuclear translocation of AIF. When CGN death induced by K5 was carried out in the presence of a general inhibitor of caspases, there was a slight decrement of cell death, but neurons eventually died by showing apoptotic-like features such as phosphatidylserine translocation and nuclear condensation. Besides, there was a significant increment of nuclear AIF translocation. When we analyzed the IAPs levels during the cerebellar development, we found a significant increase of XIAP and a significant decrease of cIAP2 and surviving in an age-dependent manner. On the other hand, we found that CGN death induced by K5 correlates with a reduction of XIAP level, whereas the survival promoted by high concentration of potassium (25 mM; K25) is associated with high XIAP levels. Moreover, we found an interaction between XIAP and caspase-3, which could be promoting caspase inhibition and cell survival. Together, these findings support the idea that AIF could be involved in an apoptotic-like death of CGN that could be an alternative mechanism of neuronal death during cerebellar development. Besides, XIAP could be involved in the neuronal survival promoted by trophic conditions in the cerebellum.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 DESARROLLO DEL CEREBELO**

Las neuronas cerebelares se distribuyen en regiones discretas, cada una de las cuales recibe proyecciones de varias porciones del cerebro y la médula espinal, y a su vez proyectan a diferentes sistemas motores. Las neuronas en la corteza del cerebelo adulto presentan un arreglo que estratifica la corteza en capas (Fig. 1). La más externa es la capa molecular (CM) formada principalmente por las dendritas de las células de Purkinje, los axones de las neuronas granulares de cerebelo (NGC) (fibras paralelas), las células de canasta, las estrelladas y las fibras de la glia de Bergmann. Por debajo está la monocapa de los somas de las células de Purkinje (capa de Purkinje: CP) con los somas de la glia de Bergmann. A la CP le sigue la capa de NGC con los somas de las células de Golgi. Finalmente, se encuentra la materia blanca (Sillitoe y Joyner, 2007). Las NGC son el tipo neuronal más abundante del sistema nervioso central (SNC) y se estima que aproximadamente el 80% de todas las neuronas cerebrales en humano son NGC (Lange, 1975).

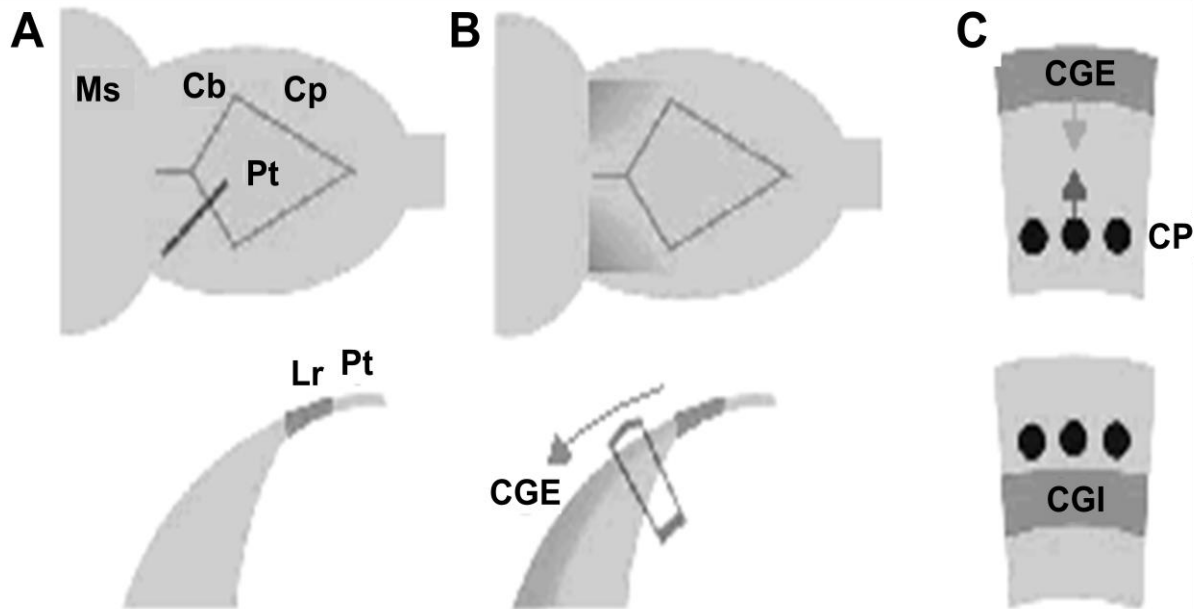
El SNC se forma a partir de regiones discretas del epitelio neural que se expanden por crecimiento diferencial. La proliferación celular en la parte rostral del tubo neural forma inicialmente tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo; que dan origen a las vesículas cerebrales secundarias y finalmente a las estructuras cerebrales maduras (Tabla 1). El cerebelo se origina de las áreas adyacentes a la placa alar (somatosensorial) del tubo neural que reside en el metencéfalo (Fig. 2). Las células cerebelares son generadas de dos zonas germinales: la zona ventricular y otra más dorsal llamada labio rómbico (Sillitoe y Joyner, 2007; Millen y Gleeson, 2008).



**Figura 1. Arreglo citoarquitectónico de la corteza cerebelar.** La figura muestra la distribución espacial de las tres capas que forman la corteza cerebelar, la ubicación de cinco tipos neuronales que forman estas capas y las interacciones entre estos tipos celulares (Modificado de Ghez y Thach, 2000).

Vesículas cerebrales primarias	Vesículas cerebrales secundarias	Estructuras cerebrales
<b>Prosencéfalo</b>	Telencéfalo	Corteza cerebral, núcleos basales, formación hipocampal, bulbo olfatorio y amígdala
	Diencefalo	Tálamo, hipotálamo, subtálamo, epitálamo, retina y nervio óptico
<b>Mesencéfalo</b>	Mesencéfalo	Cerebro medio
<b>Rombencéfalo</b>	Metencéfalo	Puente y cerebelo
	Mielencéfalo	Médula

**Tabla 1. Vesículas cerebrales durante la embriogénesis del SNC y estructuras que originan**

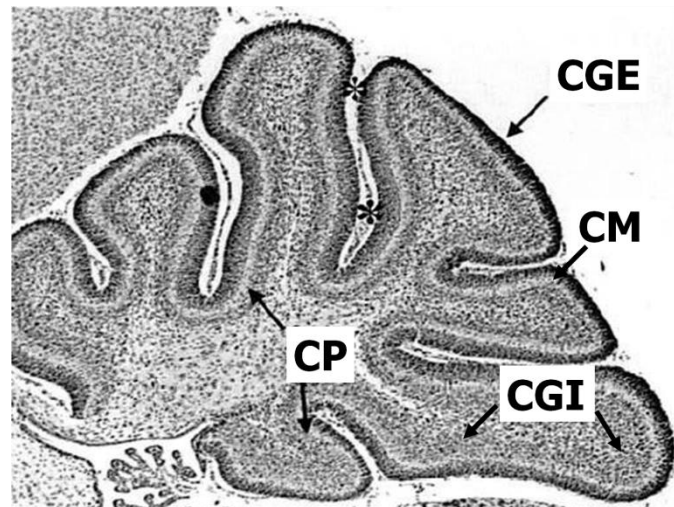


**Figura 2. Formación de la estructura precerebelar.** El labio rúbico (Lr) se genera en el punto de contacto entre el tubo neural y la placa en expansión del techo (Pt) del cuarto ventrículo. (A) Esquema del tubo neural (panel superior), que muestra la posición del Lr con relación al mesencéfalo (Ms), cerebelo (Cb) y cerebro posterior (Cp) durante el desarrollo. El panel inferior es la visión transversal de un corte imaginario (línea oscura) del panel superior. (B) Después de la inducción del Lr, las neuronas granulares de cerebelo (NGC) migran de la Pt y se acumulan formando la capa granular externa (CGE); panel superior (esquema de la vista dorsal) e inferior (visión transversal). La flecha indica la dirección de migración de las NGC. (C) Después de que los precursores de NGC se dividen de nuevo en la CGE, las NGC postmitóticas migran radialmente a través del cerebelo (panel superior), pasando la capa de células Purkinje (CP) para formar la capa granular interna (CGI) (panel inferior). Los precursores de células Purkinje se originan en la zona ventricular y migran a través de la pared del precerebelo (Modificado de Wingate, 2001).

El análisis de la expresión de genes proneurales en el terreno cerebelar revela que el epitelio ventricular embrionario inicial, del cual se originan las células Purkinje y las interneuronas cerebelares inhibitorias (células estrelladas, de canasta y de Golgi), es heterogéneo (Schilling et al, 2008). Las primeras neuronas que derivan de la zona ventricular son neuronas de los núcleos profundos del cerebelo (Goldowitz y Hamre, 1998; Schilling, 2000). Después de éstas, se generan las células de Purkinje a partir del neuroepitelio que recubre el cuarto ventrículo (Fig. 2), donde después de la fase activa de proliferación inician un proceso de migración radial para formar una estructura plana en la corteza cerebelar (Schilling, 2000).

El labio rúbico es un epitelio germinativo especializado que nunca constituye un compartimento definido que se origina, relativamente tarde, durante el desarrollo a partir de la interfase entre el tubo neural y la placa del techo del cuarto ventrículo. Los derivados del labio rúbico se caracterizan por una navegación circunferencial, independiente de glía, del tubo neural dorsal al ventral. El labio rúbico cerebelar emerge de interacciones precisas entre patrones de procesos anteroposteriores y dorsoventrales y se origina de una región axial. Su mantenimiento y expansión está regulada por señales provenientes de la zona ubicada entre el cerebro medio y el cerebro posterior. El labio rúbico cerebelar y el del cerebro posterior forma un epitelio continuo proliferativo (Wingate, 2001). Sus derivados están directamente relacionados al sistema cerebelar y precerebelar (Wingate, 2001); en particular, origina a las NGC y a algunas neuronas de los núcleos profundos del cerebelo en el dominio anterior del labio rúbico (Sillitoe y Joyner, 2007).

La formación de una matriz germinal secundaria del labio rúbico correspondiente a la capa granular externa (CGE) ocurre cuando las células de los núcleos profundos y de Purkinje dejan de dividirse (Goldowitz y Hamre, 1998). En roedores, después del nacimiento, el labio rúbico superior da origen a precursores de NGC, estos precursores son los únicos que migran sobre la superficie del cerebelo antes de llegar a la etapa final de mitosis y se acumulan formando la CGE (Fig. 2). Una vez formada, un segundo evento de división celular dentro de la CGE produce NGC postmitóticas, las cuales migran radialmente dentro de la corteza cerebelar para dar lugar a la capa granular interna (CGI) (Wingate, 2001) (Fig. 2 y 3). Los precursores de NGC exhiben una morfología unipolar donde solo un proceso neurítico guía la migración (Wingate, 2001).



**Figura 3. Cerebelo en desarrollo.** Corte sagital de un cerebelo de ratón de 7 días postnatales. Los asteriscos denotan la fisura primaria; CP, capa de células de Purkinje; CGI, capa granular interna; CM, capa molecular; CGE, capa granular externa (Modificada de Goldowitz y Hamre, 1998).

Mientras los neuroblastos de NGC migran a través de la CM y de la CP durante el desarrollo (Fig. 3), se generan las células estrelladas y de canasta a partir del neuroepitelio del cuarto ventrículo (Goldowitz y Hamre, 1998). Los precursores de las interneuronas inhibitorias de la corteza cerebelar originadas en dicho neuroepitelio migran hacia fuera a su posición final en la corteza cerebelar. Estas células continúan proliferando durante su tránsito a través de la masa cerebelar profunda y la materia blanca (Schilling, 2000).

Particularmente en rata, muy pocas NGC se forman durante los primeros cinco días postnatales, pero a partir del día postnatal (P) 8 y hasta el P15 se registra un marcado incremento en la proliferación de estas neuronas en la CGE (Altman, 1972). La migración de NGC postmitóticas inmaduras de la CGE a la CGI a través de la CM comienza entre P2-3 y termina en la tercera semana postnatal (Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988). Algunas de las NGC que han arribado a la CGI reciben los primeros contactos sinápticos excitadores provenientes de las fibras musgosas, cerca del P5. Sin embargo, se ha

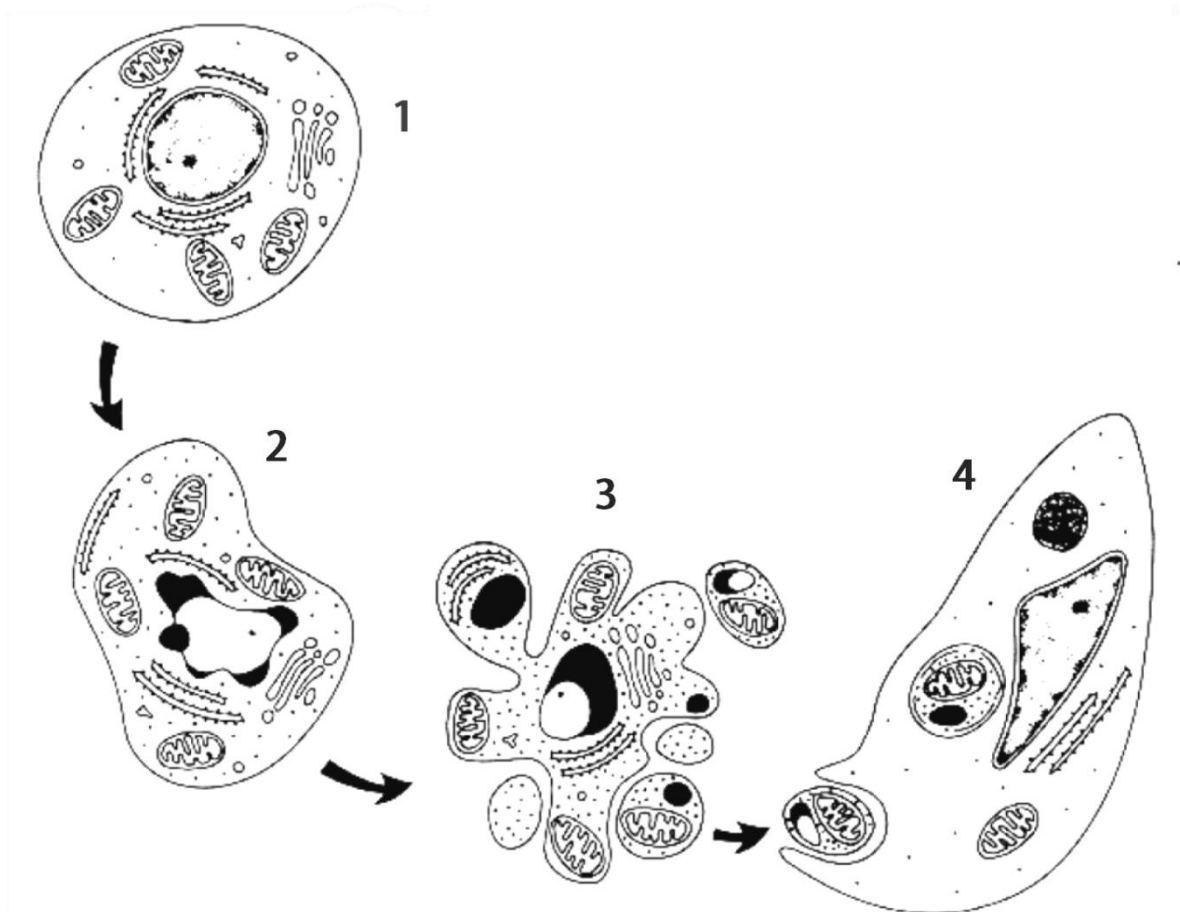


descrito que la mayoría de estos contactos sinápticos comienzan a ser funcionales entre P10-12 (Arsenio-Nuñez y Sotelo, 1985; Burgoyne y Cambray-Deakin, 1988), cuando la mayoría de las NGC han alcanzado la CGI.

## 1.2 MUERTE CELULAR APOPTÓTICA

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada en la que participa una maquinaria compleja responsable de las alteraciones morfológicas y bioquímicas que la caracterizan. Esta muerte es activa y ocurre en dos fases: en la primera, la célula se compromete a morir y después se presenta una fase ejecutora, caracterizada por cambios morfológicos notables. La apoptosis fue definida originalmente en función a dichos cambios (Fig. 4) que incluyen: condensación y fragmentación nuclear, encogimiento de organelos citoplasmáticos, decremento en el volumen celular, alteraciones en la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos con material citoplasmático y nuclear, que son fagocitados posteriormente (Gorman *et al*, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas características morfológicas se han utilizado tradicionalmente como marcadores apoptóticos.

Bioquímicamente, la apoptosis se caracteriza por una serie de eventos de desensamblaje de estructuras subcelulares, ejecutados por una maquinaria celular compleja y especializada. Algunas de las características bioquímicas de la apoptosis son la fragmentación internucleosomal del DNA, la externalización de fosfatidilserina y la activación de proteínas reguladoras del proceso apoptótico, como miembros de la familia de las caspasas y de Bcl-2, entre otras.



**Figura 4. Cambios morfológicos asociados a muerte apoptótica.** En la muerte apoptótica se mantiene la integridad de la membrana citoplasmática y de los organelos y hay condensación perinuclear de la cromatina (2). Finalmente la célula se desintegra con la formación de cuerpos apoptóticos (3) que son posteriormente fagocitados (4) (Modificado de Kerr y Harmon, 1991).

### 1.2.1 Las Caspasas

La degradación de macromoléculas ocurre principalmente por una familia de proteasas denominadas caspasas (Gorman *et al*, 1995; Thornberry y Lazebnik, 1998). El término “caspasa” hace referencia a la capacidad de estas proteasas de cisteína de romper proteínas en un residuo de ácido aspártico (Cohen, 1997). Las caspasas se expresan como zimógenos catalíticamente inactivos de 30-50 KDa que contienen un prodominio, una subunidad grande (~20 KDa) y una subunidad pequeña (~10 KDa) (Thornberry y Lazebnik, 1998; Shi, 2004). La activación de estas enzimas involucra un

procesamiento proteolítico entre los diferentes dominios, seguido por una re-asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterotetrámero activo (Thornberry y Lazebnik, 1998; Budihardjo *et al*, 1999) que consta de 2 subunidades grandes y 2 subunidades pequeñas con la presencia de 2 sitios catalíticos. El sitio activo de las caspasas es un pentapéptido de estructura general QACXG, donde X es R, Q o G (Cohen, 1997).

Durante un evento apoptótico, las caspasas actúan de manera secuencial en una cascada proteolítica de activación de caspasas y degradación de estructuras subcelulares (Fig. 5). De acuerdo a su participación en la cascada proteolítica, las caspasas se clasifican en caspasas iniciadoras (como las caspasas-8, -9 y -10) y caspasas efectoras (como las caspasas-3, -6 y -7). Las caspasas efectoras existen constitutivamente como homodímeros antes y después del procesamiento proteolítico (Shi, 2004) y su actividad catalítica se incrementa varios órdenes de magnitud después de dicho procesamiento (Salvesen y Dixit, 1999; Shi, 2004). Por el contrario, el procesamiento autocatalítico en las caspasas iniciadoras tiene un modesto efecto en su actividad catalítica (Stennicke *et al*, 1999; Srinivasula *et al*, 2001). En este caso, se considera que el reclutamiento y dimerización de estas caspasas es el factor que promueve su activación (Renatus *et al*, 2001; Boatright *et al*, 2003; Donepudi *et al*, 2003; Shi, 2004). Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras y éstas actúan directamente sobre los substratos subcelulares específicos para cada caspasa (Fig. 5). Entre los substratos de las caspasas efectoras se encuentran la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), láminas de la envoltura nuclear, la ribonucleoproteína nuclear pequeña U1 de 70 KDa, entre otros.

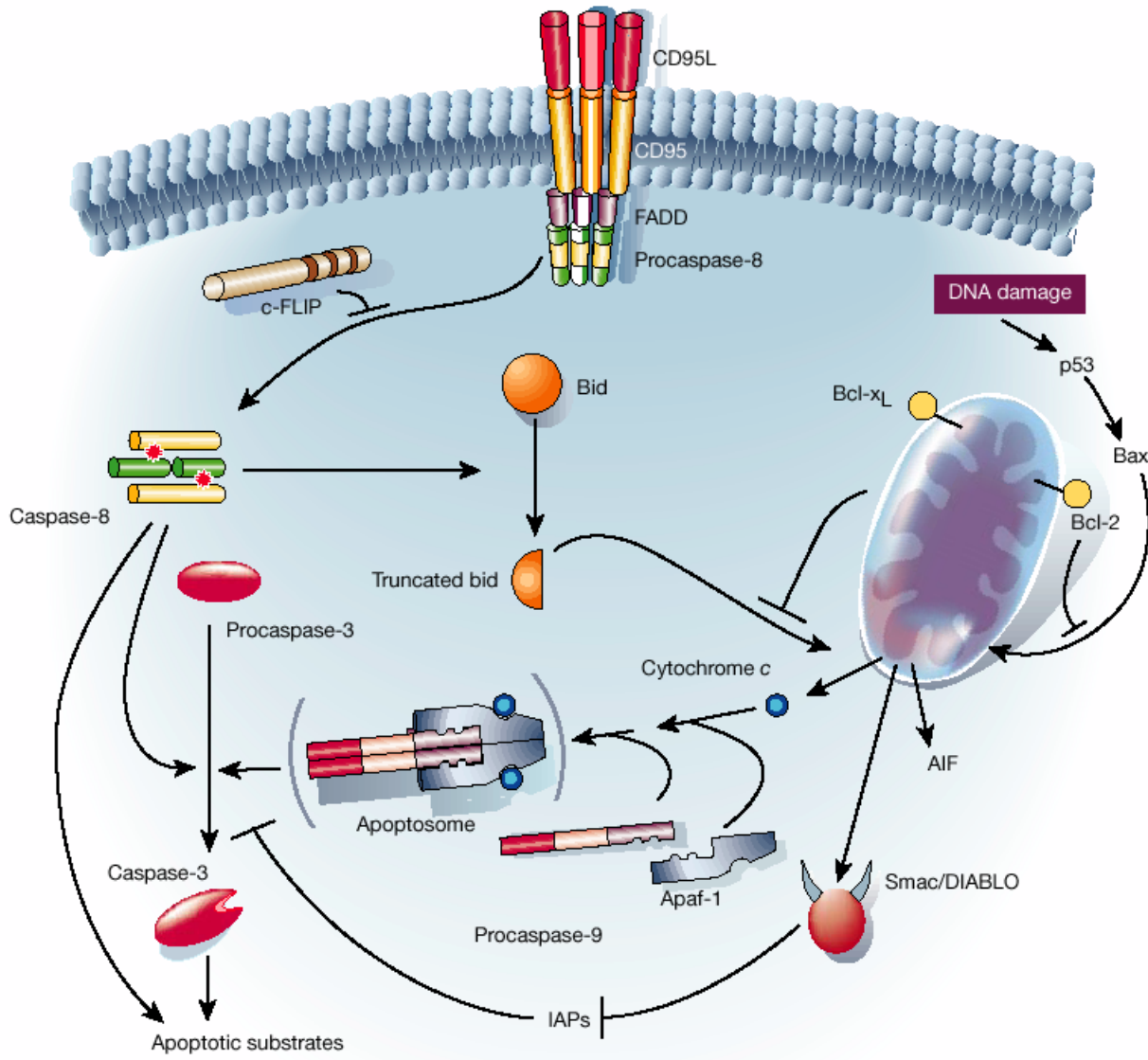
Se han descrito dos vías convergentes de muerte apoptótica mediada por caspasas (Fig. 5): la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca está mediada por receptores

de muerte (por ejemplo el receptor del factor de necrosis tumoral: TNFR, o el receptor Fas); en este caso, la activación del receptor por su ligando resulta en la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), el reclutamiento de las procaspasas -8 ó -10 y su autoactivación (Fig. 5). A su vez, la caspasa-8 activa a la caspasa-3 y esta degrada substratos subcelulares. Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial, la cual puede ocurrir después de un daño al DNA, inicia con la liberación mitocondrial de citocromo c al citoplasma. En el citoplasma, el citocromo c se asocia con Apaf-1 y, junto con ATP, forma el apoptosoma con el reclutamiento y activación de caspasa-9 (Fig. 5), la que a su vez activa a la caspasa-3 (Salvesen y Duckett, 2002).

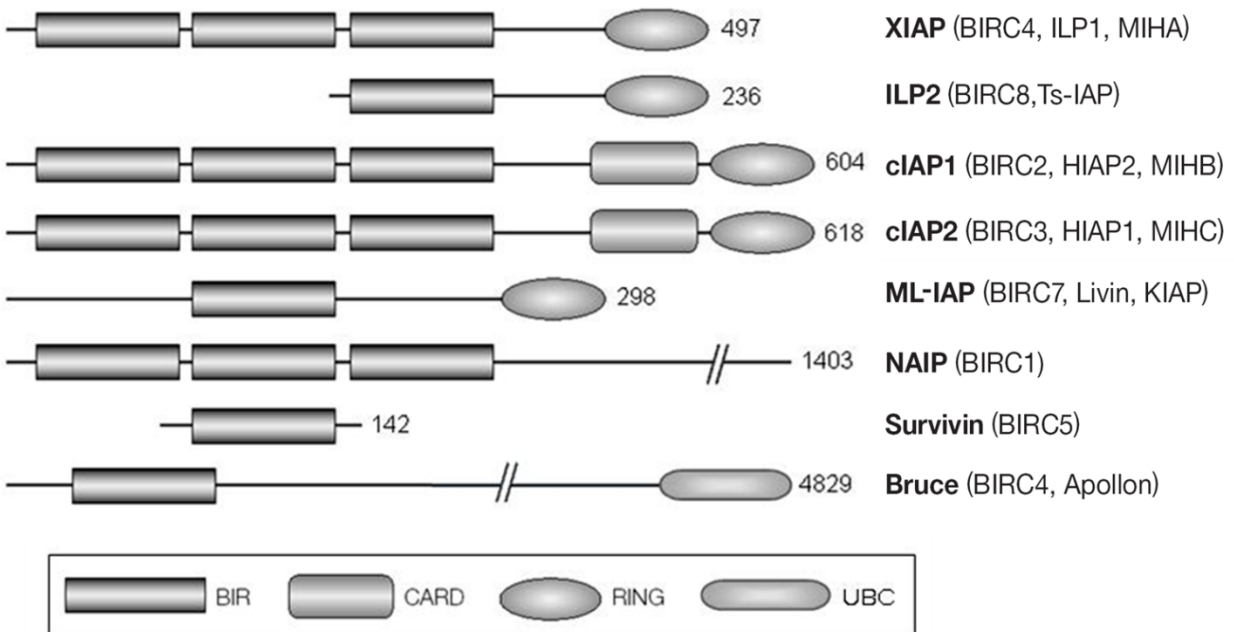
### 1.2.2 Proteínas Inhibidoras de Apoptosis

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*) son reguladores negativos de las caspasas. Hasta el momento se ha descrito la presencia de IAPs en virus, levaduras, nemátodos, insectos y mamíferos (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). En humanos se han identificado ocho IAPs (Fig. 6), denominadas: NAIP, cIAP-1/hIAP-2/MIHB, cIAP-2/hIAP-1/MIHC, XIAP/hILP-1/MIHA, survivina/TIAP, ILP-2/Ts-IAP, ML-IAP/Livin/KIAP y Bruce/Apollon (Rothe *et al*, 1995; Duckett *et al*, 1996; Liston *et al*, 1996; Ambrosini *et al*, 1997; Hauser *et al*, 1998; Chen *et al*, 1999; Vucic *et al*, 2000; Richter *et al*, 2001).

Estructuralmente las IAPs se componen de varios dominios. En el extremo amino-terminal, las IAPs contienen al menos una copia del dominio altamente conservado denominado BIR (*baculovirus IAP repeat*; Fig. 6) (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). Los dominios BIR son importantes en la interacción proteína-proteína, así que pueden unirse directamente a las caspasas e inhibirlas (Mace *et al*, 2010).



**Figura 5. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.** Vía extrínseca: mediada por la activación de receptores de muerte (como Fas (CD95) y TNFR) por su ligando. Lo que induce la oligomerización, a través de proteínas adaptadoras (como FADD: *Fas-Associated Death Domain Protein*), del complejo DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Acompañado por el reclutamiento y activación de caspasa-8 (que puede bloquearse por el reclutamiento de c-FLIP), la cual activa a la caspasa-3. Vía intrínseca: activada por señales de estrés celular y daño como en el DNA. Se activan miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (como Bax) que se insertan en la mitocondria, promoviendo la liberación de citocromo c y la oligomerización del apoptosoma (Apaf-1, dATP y procaspasa-9). Lo que activa a la caspasa-9, la cual activa a la caspasa-3. Las caspasas son antagonizadas por la familia de las IAPs, que a su vez son antagonizadas por Smac/DIABLO. Ambas vías pueden comunicarse mediante Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2), que es activado por caspasa-8 y se transloca a la mitocondria promoviendo la liberación de citocromo c (Tomado de Hengartner, 2000).

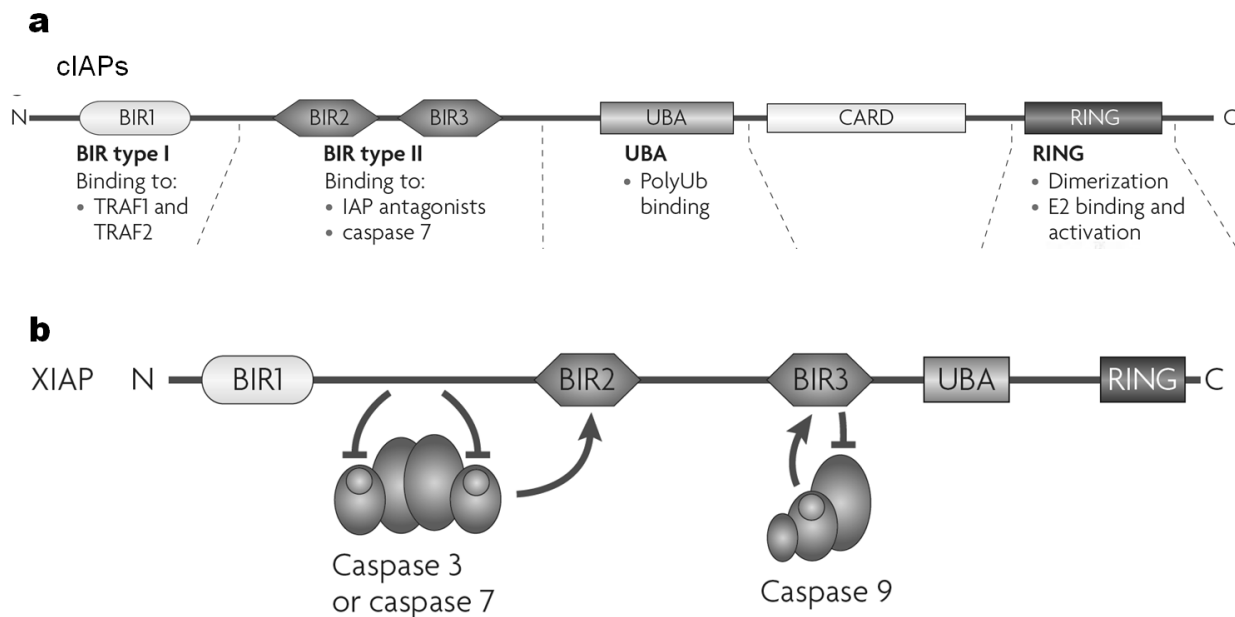


**Figura 6. IAPs de mamíferos.** Los nombres alternativos para cada IAP se muestran entre paréntesis. Los números que se observan en el extremo carboxilo-terminal indican la cantidad total de aminoácidos de cada IAP. Se observa la ubicación de los dominios estructurales de las IAPs; BIR, CARD, RING y UBC. Su descripción se detalla en el texto (Modificado de Salvesen y Duckett; 2002).

La presencia de múltiples dominios BIR les confiere a las IAPs la habilidad de interactuar con varias proteínas (Gyrd-Hansen y Meier, 2010; Mace et al, 2010), de acuerdo a esto pueden ser agrupados en tipo I y tipo II (Fig. 7). Los BIR tipo II se unen a un tetrapéptido amino-terminal llamado IBM (*IAP-binding motif*, presente en caspasas y antagonistas de las IAPs) y los tipo I no se unen a caspasas y a sus antagonistas (Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

Algunas IAPs también presentan en el extremo carboxilo-terminal el dominio conservado RING (Fig. 6; Liston *et al*, 1996; Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002). El dominio RING le confiere a las IAPs una actividad de E3 ligasa (transfiere residuos de ubiquitina [Ub] de una enzima E2 [conjugante de Ub] a las proteínas sustrato (Mace et al, 2010)) importante en el sistema de degradación de proteínas por el

proteasoma. Además, poseen una pequeña región, después de los dominios BIR, homóloga al dominio asociado a Ub (UBA; Fig. 7) donde se unen cadenas de Ub (Mace et al, 2010). Las cIAPs poseen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (Fig. 6; Hofmann *et al*, 1997), localizado entre los dominios BIR y RING (Deveraux y Reed, 1999). La estructura y función del dominio CARD en estas IAPs no ha sido determinado (Gyrd-Hansen y Meier, 2010; Mace et al, 2010). El dominio CARD parece no ser necesario en la actividad inhibitoria de caspasas (Roy *et al*, 1997). Particularmente, BRUCE contiene un dominio conjugante de Ub (UBC) funcionalmente intacto (Fig. 6; Hauser *et al*, 1998;



**Figura 7. Función de algunos dominios de las IAPs y regulación de caspasas.** a) Esquema de los dominios de las cIAPs: 3 dominios BIR, el UBA, el CARD y el RING. Los dominios BIR de las IAPs se agrupan en el tipo I (gris claro: BIR1) y el tipo II (gris oscuro: BIR2 y BIR3). Las caspasas y antagonistas de las IAPs interactúan con los dominios BIR tipo II, mientras que TRAF1 (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 1) y TRAF2 interactúan con los dominios BIR tipo I. Las cadenas de poliubiquitina (*polyUb*) se unen al dominio UBA y se desconoce la función del dominio CARD. El dominio RING se requiere para la actividad E3, para su dimerización y para la unión con enzimas E2. b) Esquema de los dominios de XIAP: 3 dominios BIR (el tipo I en gris claro: BIR1; y el tipo II en gris oscuro: BIR2 y BIR3), el UBA y el RING. XIAP directamente inhibe a las caspasas-3, -7 y -9. La secuencia previa a BIR2 ocupa el sitio catalítico de las caspasas -3 y -7 (bloqueando la entrada al sustrato), mientras que BIR2 interactúa con el motivo IBM de las caspasas (motivo que se expone después de su activación). La inhibición de caspasa-9 por XIAP requiere de la unión de BIR3 al motivo IBM de la caspasa. Así, la XIAP previene la dimerización y activación de caspasa-9 (Modificado de Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

Deveraux y Reed, 1999) que le confiere actividad de una enzima E2 en el sistema del proteosoma (Hauser *et al*, 1998).

Una gran cantidad de datos bioquímicos y estructurales muestran que las IAPs regulan a las caspasas a través de distintos mecanismos y que diferentes miembros de la familia presentan diferentes funciones (Shi, 2004). Un aspecto importante de las IAPs es que son los únicos factores celulares que pueden actuar sobre caspasas iniciadoras y efectoras (Deveraux y Reed, 1999; Salvesen y Duckett, 2002; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004).

De las IAPs humanas, la XIAP es la mejor caracterizada e inhibe a las caspasas -3, -7 y -9. XIAP contiene 3 dominios BIR (BIR1, BIR2 y BIR3; Fig. 6 y 7) que no son funcionalmente equivalentes. El análisis cristalográfico de XIAP revela que los aminoácidos de la región de enlace entre BIR1 y BIR2 es una secuencia crítica en la inhibición de las caspasas -3 y -7 (Fig. 7; Riedl *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). La interacción ocurre entre la parte amino-terminal de la región flexible que precede a BIR2 y la hendidura de unión al substrato de la proteasa (Stennicke *et al*, 2002). Por su parte, BIR2 es requerido para alinear y estabilizar la interacción caspasa-IAP (Chai *et al*, 2001; Huang *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). BIR2 hace contacto con el motivo IBM presente en el extremo amino-terminal de una de las subunidad de la caspasa activa. Dicho extremo se descubre después de la proteólisis de activación de las caspasas -3 y -7 (Riedl *et al*, 2001; Scott *et al*, 2005; Gyrd-Hansen y Meier, 2010). La secuencia de inhibición se une al sitio activo de la caspasa para excluir al substrato y BIR2 restringe el acceso al substrato (Riedl *et al*, 2001; Stennicke *et al*, 2002; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004).

El mecanismo de inhibición de caspasa-9 por XIAP difiere del modo de inhibición de caspasa-3 y -7. En la inhibición de caspasa-9, los estudios mutacionales indican que se



requiere la unión de la superficie de un surco presente en BIR3 con el extremo amino-terminal (motivo IBM, que se expone después del procesamiento proteolítico) de la subunidad pequeña de la caspasa-9 (Fig. 7; Shiozaki *et al*, 2003; Srinivasula *et al*, 2001; Stennicke *et al*, 2002; Shi, 2004). XIAP heterodimeriza con la caspasa-9 monomérica procesada e interfiere en la homodimerización requerida para la completa activación de la caspasa (Shiozaki *et al*, 2003; Shi, 2004; Gyrd-Hansen y Meier, 2010).

Las IAPs son reguladas positiva y negativamente en varios niveles. Por una parte, presentan diferentes patrones de expresión génica, lo que sugiere que los miembros de esta familia multigénica no son redundantes (Nachmias *et al*, 2004). Otro mecanismo de regulación de las IAPs es su fragmentación proteolítica por las caspasas -3, -6 ó -7. Se ha descrito la proteólisis por caspasas de XIAP, cIAP-1, Livin (Nachmias *et al*, 2004) y BRUCE (Bartke *et al*, 2004). Por otro lado, las IAPs también se regulan por degradación proteosomal. Particularmente, durante la apoptosis, la XIAP y la cIAP-1 pueden entrar en un proceso de autoubiquitinación, marcándolas para la degradación proteosomal (Yang *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004). Así, la autoubiquitinación es un mecanismo mediante el cual ciertas IAPs pueden regular negativamente su propia actividad (Nachmias *et al*, 2004). Además, se ha propuesto que la fosforilación está involucrada en la regulación de algunas IAPs. La fosforilación de XIAP por Akt promueve la sobrevivencia celular ya que esto reduce su ubiquitinación y le confiere estabilidad a XIAP (Dan *et al* 2004). Por su parte, la actividad antiapoptótica de las IAPs es inhibida por proteínas proapoptóticas que contienen un motivo IBM (Shi, 2002a; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004). Los dominios BIR (tipo II) también son los sitios de unión a dichas proteínas (Gyrd-Hansen y Meier, 2010), entre ellas se encuentra Smac/DIABLO (Du *et al*, 2000; Verhagen *et al*, 2000; Stennicke *et al*, 2002) y Omi/HtrA2 (Suzuki *et al*, 2001a; Hegde *et al*, 2002; Stennicke *et al*, 2002).

Después de una señal apoptótica, Smac/DIABLO se libera de la mitocondria e interactúa con múltiples IAPs eliminando la inhibición de caspasas por éstas (Chai *et al*, 2000; Nachmias *et al*, 2004; Shi, 2004). El análisis estructural revela que el motivo IBM de Smac (similar al de caspasa-9) se une a la superficie del surco de BIR3 de XIAP (Liu *et al*, 2000; Wu *et al*, 2000) y eso libera a la caspasa-9 de la inhibición mediada por XIAP (Shi, 2004). Por su parte, estudios de modelaje indican que cuando BIR2 se une a un dímero de Smac, el péptido requerido para la inhibición de caspasa-3 está parcialmente cubierto por Smac (Chai *et al*, 2001) y así se excluye la unión simultánea con la caspasa (Shi, 2004). Esto es consistente con el dato de que Smac monomérica interacciona débilmente con BIR2 y es incapaz de remover la inhibición de caspasa-3 mediada por XIAP (Chai *et al*, 2000; Shi, 2004). Smac también se une a BRUCE y elimina su función inhibidora por el desalojo de las caspasas unidas al dominio BIR y previniendo el enlace de BRUCE con las caspasas (Bartke *et al*, 2004).

Los dominios BIR de XIAP también se unen a Omi/HtrA2 y al factor asociado a XIAP (XAF-1). Al igual que Smac, XAF-1 tiene la habilidad de impedir la inhibición de caspasas mediada por XIAP (Liston *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004). XAF-1 es una proteína nuclear que secuestra a la XIAP en el núcleo y por lo tanto inhibe su actividad antiapoptótica (Liston *et al*, 2001; Nachmias *et al*, 2004).

Por otro lado, la actividad de E3 de las IAPs ha mostrado promover la degradación de sus substratos. Por ejemplo, XIAP puede ubiquitinar a la caspasa-3 activa y de este modo marcarla para su degradación proteosomal (Suzuki *et al*, 2001b; Nachmias *et al*, 2004). No está claro el mecanismo por el cual las IAPs promueven su propia degradación o la de sus blancos (Nachmias *et al*, 2004). Smac fue identificado como substrato de ubiquitinación de la actividad E3 de XIAP (MacFarlane *et al*, 2002). Por su parte

BRUCE/Apollon cataliza la ubiquitinación de Smac y caspasa-9 facilitando su degradación proteosomal (Bartke *et al*, 2004; Hao *et al*, 2004). También, se ha mostrado que la interacción entre survivina y Smac es crucial para la habilidad de survivina de inhibir la apoptosis (Song *et al*, 2003; Nachmias *et al*, 2004).

Finalmente, las IAPs presentan otras funciones además de regular la muerte apoptótica (Nachmias *et al*, 2004). Por ejemplo, la survivina juega un papel importante en la regulación de la mitosis (Li *et al*, 1999; en Nachmias *et al*, 2004) y las cIAPs y la XIAP están involucradas en procesos de transducción de señales (Rothe *et al*, 1995; en Nachmias *et al*, 2004). En el caso específico de las cIAPs, éstas se han identificado bioquímicamente (Rothe *et al*, 1995) como parte de un complejo de señalización que se recluta al dominio citoplasmático del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Salvesen y Duckett, 2002). Este reclutamiento es dependiente de su unión, mediada por dominios BIR, al heterocomplejo TRAF1/TRAF2 (factor asociado a TNFR tipo 1/2; Rothe *et al*, 1995) y se ha descrito que TRAF1/2 y las cIAPs trabajan conjuntamente para suprimir la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) en el complejo intracelular de señalización de TNFR1 (Wang *et al*, 1998). Por su parte, cIAP-2 y XIAP se han implicado en la activación del factor transcripcional NF $\kappa$ B (el cual induce la expresión de varios genes antiapoptóticos, incluyendo las IAPs), y de este modo protegiendo de la apoptosis inducida por TNF (cIAP-2; Chu *et al*, 1997) o promoviendo la sobrevivencia celular (XIAP; Hofer-Warbinek *et al*, 2000). Mientras que NAIP, XIAP y Livin son capaces de activar a la cinasa de Jun 1 (JNK1). JNK fosforila al factor transcripcional c-jun (entre otros) activándolo, de este modo dichas IAPs pueden modular la actividad de factores transcripcionales como c-jun (Nachmias *et al*, 2004). Particularmente, XIAP interactúa con dos tipos de receptores celulares. XIAP se une, mediante su dominio RING, al receptor de

la proteína morfogenética del hueso (BMP) tipo 1 (Yamaguchi *et al*, 1999) y modula la cascada de señalización por debajo de este receptor. También se une al receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tipo 1, modulando alguna de las vías de señalización activadas en respuesta a TGF- $\beta$ : transcripción dependiente de NF $\kappa$ B, JNK o SMAD (Birkey Reffey *et al*, 2001).

### 1.2.3 IAPs en la Supervivencia Neuronal

Se ha sugerido que las IAPs pueden ser importantes en la protección ante el daño neuronal, como el que ocurre en un cuadro isquémico y en la supervivencia celular que se observa por acción de agentes tróficos. Concretamente, se ha descrito que la estimulación con el factor de crecimiento neuronal (NGF) en neuronas sensoriales y simpáticas en cultivo induce rápidamente la expresión de ITA (homólogo de pollo de cIAP-2). En dichos cultivos, la sobreexpresión de ITA promueve supervivencia neuronal en ausencia de NGF, mientras que la expresión del RNA antisentido de la IAP, neutraliza el efecto trófico de NGF (Sendtner, *et al*; 2000).

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

liberación de citocromo c al citosol, las neuronas simpáticas son resistentes a la inyección de citocromo c. Esto como resultado de la regulación de XIAP sobre la activación de caspasas. De este modo, las neuronas simpáticas deficientes de XIAP mueren rápidamente con citocromo c en el citosol. Conjuntamente, la liberación de Smac endógeno no es suficiente para evitar la resistencia dependiente de XIAP de estas neuronas. Así, la remoción de la inhibición por XIAP es necesaria y suficiente en la activación de caspasas dependiente de citocromo c en neuronas simpáticas (Potts, *et al*; 2003).

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

Los ratones carentes de NAIP1 muestran un desarrollo normal. Sin embargo, en estos animales se reduce notablemente la sobrevivencia de neuronas piramidales de

hipocampo después de un daño límbico inducido por ácido kaínico. A pesar de que NAIP1 parece no ser necesaria para el desarrollo normal del ratón, la expresión de NAIP1 se requiere para la sobrevivencia neuronal en condiciones patológicas (Holcik, *et al*; 2000). Por su parte, la estimulación con bajas concentraciones de N-metil-D-aspartato (NMDA) incrementa los niveles de XIAP en neuronas hipocampales en cultivo, mientras que reduce los niveles de mRNA y la proteína de caspasa-3. El tratamiento con NMDA también inhibe la activación de caspasa-3 y las neuronas son más resistentes a la muerte causada por altas concentraciones de glutamato y estaurosporina (Korhonen, *et al*; 2004).

En el caso particular de fetos afectados con Síndrome de Down (SD) se han observado niveles reducidos del mRNA de NAIP. Asimismo, se han observado disminuidos los niveles de la proteína en cerebros de adultos con SD, especialmente en la corteza occipital de los pacientes con SD que presentan neurodegeneración tipo Alzheimer (Seidl, *et al*; 1999). Además, se ha reportado que los niveles de NAIP están reducidos en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Christie et al., 2007).

#### **1.2.4 Factor Inductor de Apoptosis**

Entre las moléculas que promueven la apoptosis está una flavoproteína denominada factor inductor de apoptosis (AIF; Susin, et al, 1999), la cual promueve muerte apoptótica independiente de caspasas. AIF es una oxidoreductasa importante en el control redox y la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Joza et al, 2009). La proteína precursora de AIF (~67 KDa) tiene una secuencia de localización mitocondrial que es removida después de su importe al espacio intermembranal (Susin, et al, 1999). Ya en la mitocondria, la proteína se repliega, incorpora el dinucleótido flavin adenina (como grupo

prostético requerido para su actividad NADH oxidasa) y se ancla a la membrana interna mediante un segmento transmembranal (Joza et al, 2009). Después de un estímulo apoptótico y la permeabilización de la membrana externa, la porción transmembranal se fragmenta por una proteasa de cisteína (probablemente una calpaína o catepsina) permitiendo la liberación al citosol de la proteína apoptogénica soluble (Fig. 8; Joza et al, 2009). El AIF liberado de la mitocondria se transloca al núcleo, donde éste induce características nucleares de apoptosis como la condensación de cromatina y fragmentación a gran escala del DNA (~50 Kb) (Fig. 8; Joza et al, 2009).

Está bien documentada la translocación mitocondria-núcleo de AIF en la muerte celular durante el desarrollo, en respuesta a agentes genotóxicos, por excitotoxicidad (inducida por NMDA/glutamato), durante hipoxia-isquemia seguida por reperfusión, en procesos neurodegenerativos o por exposición a patógenos (Fig. 8). Esto ha sugerido un papel de AIF en un amplio espectro de paradigmas de muerte celular. Mediante estudios de eliminación o regulación genética a la baja, se determinó que la contribución de AIF en la muerte celular es dependiente del tipo celular y/o del inductor apoptótico. Actualmente, la translocación de AIF se considera indispensable para la muerte programada de neuronas y fotorreceptores, inducida por excitotoxinas, hipoxia-isquemia, hipoglicemia o privación de soporte trófico (Hangen et al, 2010a).

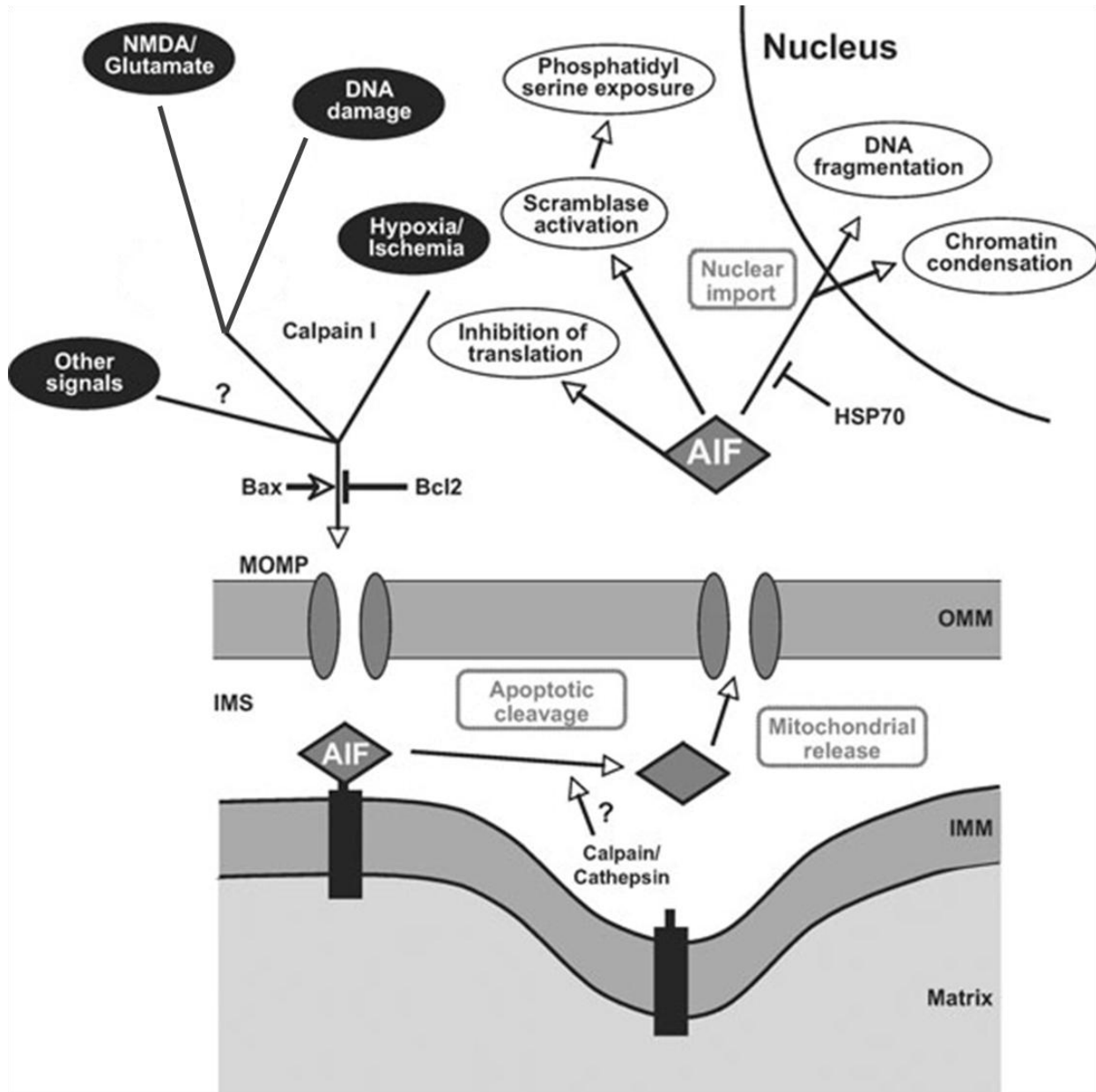
### **1.3 MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBELO**

Durante el desarrollo, ocurre un proceso de muerte celular masiva en ciertas poblaciones del sistema nervioso (SN) (Oppenheim, 1991). Dicho proceso es tejido-específico y reproducible espacio-temporalmente. Presentándose muerte celular de un

número importante de células proliferativas en regiones germinales de diversos tejidos nerviosos, incluyendo el cerebelo. La muerte neuronal en el desarrollo del SN ocurre tanto en células progenitoras no diferenciadas, como durante la sinaptogénesis de neuronas en diferenciación (Buss et al, 2006), y puede ser una muerte celular de tipo apoptótica. De este modo, se ha determinado la participación de algunas caspasas en los procesos de muerte neuronal observados durante el desarrollo del SN. En ratones deficientes de caspasa-3 se observó un incremento en la cantidad de neuronas y serios problemas de desorganización en estructuras neuronales (Kuida et al, 1996). Por su parte, los ratones deficientes de caspasa-9 mueren perinatalmente con malformaciones cerebrales causadas por una reducción de apoptosis durante el desarrollo temprano del cerebro (Kuida et al, 1998). Por lo anterior, se considera que las caspasas -3 y -9 son relevantes en los procesos de muerte durante el desarrollo del SN.

Particularmente, durante el desarrollo postnatal de la rata ocurre muerte de NGC de naturaleza apoptótica (Koppel et al, 1983; Wood et al, 1993; Alavez et al., 2006a, 2006b). Así, se han identificado NGC que muestran fragmentación de DNA principalmente en la CGE, presentando un máximo a P9 (Tanaka y Marunouchi, 1998). En cultivos organotípicos de cerebelo de ratas de P9 se detectó la presencia *in situ* de la forma activa de caspasa-3 en NGC de la CGE. La distribución de caspasa-3 activa es similar a la del DNA fragmentado en el cerebelo postnatal de rata *in vivo* (Tanaka et al, 2000). Consistente con lo anterior, se ha determinado la presencia de núcleos condensados a P4 y P8 en la CGE, la CM y la CGI, presentando un máximo en la CM y la CGI a P8. Además de la detección de actividad de caspasas incluyendo la -3 y la -9 en homogenados de cerebelo de ratas postnatales (Alavez et al, 2006b).





**Figura 8. AIF media efectos nucleares y citoplasmáticos de la muerte celular programada en respuesta a diversos estímulos.** En células sin estímulo de muerte, AIF está anclada a la membrana interna de la mitocondria (IMM) por un segmento transmembranar amino-terminal. Después de un estímulo apoptótico y la permeabilización de la membrana externa (MOMP), AIF es cortado por una proteasa, generando la proteína apoptogénica madura, la cual es liberada del espacio intermembranar (IMS). AIF se transloca al núcleo y promueve la condensación de la cromatina y la fragmentación de DNA. En *C. elegans*, se ha demostrado que AIF estimula la actividad de una scramblasa, proteína translocadora de lípidos, resultando en la externalización de la fosfatidíserina. Además, AIF también puede bloquear la síntesis de proteínas. OMM, membrana mitocondrial externa; HSP70, proteína de shock térmico 70 (Modificado de Joza et al, 2009).

## II. ANTECEDENTES

Los cultivos primarios de NGC se han utilizado como modelo de estudio de mecanismos de muerte neuronal. En esta preparación se ha demostrado que la despolarización crónica con KCl (25 mM) o la estimulación de los receptores a glutamato tipo NMDA (NMDA 150  $\mu$ M), promueven la sobrevivencia y diferenciación de NGC (Gallo et al, 1987; Balàzs et al, 1988; Morán y Patel, 1989a, 1989b; Balàzs et al, 1992; Burgoyne et al, 1993; Alavez et al, 1996; Morán et al, 1996; Balàzs et al, 1998; Morán et al, 1999; Xifro et al, 2005). Así, el efecto trófico que ejerce el glutamato sobre las NGC es a través de los receptores NMDA. Las NGC cultivadas en condiciones no despolarizantes (KCl 5 mM) mueren con características apoptóticas y la despolarización producida por el KCl (25 mM) o la estimulación de los receptores NMDA, retardan de manera sensible este proceso (D`Mello *et al*, 1993; Xifro et al, 2005). Se ha sugerido que la diferenciación y sobrevivencia promovidas por el NMDA en NGC en condiciones *in vitro*, mimetiza el efecto *in vivo* en estas neuronas, de la activación de los receptores a glutamato modulada por las fibras musgosas provenientes de los núcleos pontinos en periodos específicos del desarrollo cerebelar (Gallo et al., 1987; Balàzs et al, 1988). Los estudios realizados *in vitro* con NGC inmaduras sugieren que el arribo de la porción glutamatérgica de las fibras musgosas a la corteza cerebelar juega un papel importante en la sobrevivencia y/o muerte de las NGC, contribuyendo en la formación a nivel funcional y estructural del cerebelo.

En esta preparación, se ha examinado la expresión endógena de algunos miembros de la familia de las IAPs. Simons y colaboradores (1999) solo detectaron la expresión de cIAP-1 (RIAP2: IAP2 de rata) y sus niveles no cambian cuando las NGC son transferidas de condiciones despolarizantes a no despolarizante de potasio. Recientemente nuestro

grupo ha determinado la expresión basal de cIAP1, cIAP2, XIAP y survivina, pero no de BRUCE en NGC mantenidas en 25 mM de KCl (Maycotte et al, 2008) y se ha reportado la inmunoprecipitación de caspasa-3 con XIAP en NGC cultivadas en presencia de NMDA (Xifro et al, 2006).

Por su parte, la sobreexpresión de algunas IAPs protege a las NGC de algunos estímulos apoptóticos. Cuando se induce la expresión de las proteínas humanas de XIAP, cIAP-1, cIAP-2 y NAIP humanas, se observa un retardo en la muerte apoptótica de NGC en condiciones no despolarizantes (Simons et al, 1999). Por otra parte, la sobreexpresión de la XIAP humana protege a las NGC de la muerte apoptótica inducida no sólo por la remoción aguda de condiciones despolarizantes, sino también por la privación de suero (Eldadah et al, 2000). Sin embargo, cuando las NGC en cultivo se someten a un estímulo apoptótico excitotóxico, la sobreexpresión de XIAP, cIAP-1, cIAP-2 y NAIP no las protege de la muerte (Simons et al, 1999).

Por otro lado, hay numerosos estudios que muestran la participación de AIF en la muerte de NGC en cultivo bajo diferentes condiciones. Estudios previos han mostrado que durante la muerte inducida por estrés oxidativo (Fonfría et al., 2002) o daño hipóxico (Russell et al., 2007), AIF se transloca al núcleo de manera independiente de la activación de caspasas. Sin embargo, bajo otras condiciones, la participación de AIF parece ser dependiente de la actividad de caspasas (Slagsvold et al., 2003; Diwakarla et al., 2009). No hay evidencia experimental disponible que muestre el papel de AIF en la muerte celular programada de NGC durante el desarrollo del cerebelo *in vivo* o en NGC cultivadas bajo condiciones que mimeticen el proceso de desarrollo.

Con base en lo anterior, se observa que moléculas reguladoras de apoptosis como AIF y las IAPs pueden modular procesos de sobrevivencia/muerte de NGC. Sin embargo,

la importancia y los mecanismos por los cuales esto ocurre no están claros hasta el momento. Por un lado, las IAPs podrían regular la sobrevivencia promovida por condiciones tróficas y por otro, no hay información concluyente sobre la importancia de AIF en el proceso de muerte de NGC inducida por privación de influencias tróficas. Más aún, es importante determinar la correlación de los mecanismos que regulan los procesos de sobrevivencia/muerte de neuronas en cultivo con lo observado *in vivo*. Hasta el momento, no hay evidencia experimental disponible que muestre el papel de AIF y de las IAPs en la muerte celular programada de NGC durante el desarrollo del cerebelo *in vivo* o en NGC cultivadas bajo condiciones que mimeticen el proceso de desarrollo.

En este trabajo se exploró el papel de AIF y de algunos miembros de la familia de las IAPs en los procesos de sobrevivencia/muerte de NGC en cultivo, así como la expresión de dichas moléculas durante el desarrollo del cerebelo. Así, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los elementos que regulan la muerte neuronal durante el desarrollo del cerebelo y permite evaluar el papel de las IAPs y de AIF en los procesos normales de desarrollo.

### III. HIPÓTESIS

Si moléculas como las IAPs y AIF modulan la sobrevivencia neuronal, la expresión y/o distribución de estas moléculas mostrarán cambios asociados con muerte neuronal tanto en el desarrollo del cerebelo como en NGC cultivadas en condiciones tróficas que promueven su supervivencia.

### IV. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Determinar la participación de miembros de la familia de las IAPs y de AIF en los procesos de sobrevivencia y muerte de NGC en cultivo, así como durante el desarrollo del cerebelo *in vivo*.

#### Objetivos particulares

- Determinar los niveles basales de AIF y de miembros de las IAPs en NGC y en el cerebelo durante el desarrollo.
- Determinar cambios en los niveles de AIF y de miembros de las IAPs en NGC bajo condiciones no despolarizantes de bajo potasio (5 mM de KCl; K5).
- Determinar la translocación de AIF de la mitocondria al núcleo de NGC bajo condiciones de muerte celular inducido por K5.
- Examinar durante el desarrollo del cerebelo la presencia de células con núcleos positivos a AIF en las diferentes capas de la corteza cerebelar y determinar si su presencia es un evento generalizado o localizado.
- Integrar los resultados obtenidos a fin de evaluar la importancia de AIF y las IAPs en la muerte neuronal durante el desarrollo.

## V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE NGC

Se hicieron cultivos primarios de NGC de ratas Wistar de 8 días de nacidas de acuerdo a la técnica descrita por Morán y Patel (1989a). Se utilizó medio de cultivo basal Eagle suplementado con suero fetal bovino (10%) inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. La densidad final de los cultivos fue de  $1.5 \times 10^6$  células/ml. Para permitir la adherencia neuronal, las cajas fueron previamente tratadas con 25 µM de poli-L-lisina. Después de 20h a las células se les añadió citosina arabinosa (10 µM) para impedir la proliferación de células no neuronales. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y aire saturado con vapor de agua (95%). Las NGC se mantuvieron crónicamente (hasta su análisis) en bajo (5 mM de KCl; K5) o alto potasio (25 mM de KCl; K25). Otro grupo de cultivos estuvieron 2 días en K5 y después se trataron con K25 hasta su análisis a diferentes días *in vitro* (DIV).

### 5.2 VIABILIDAD CELULAR Y TRANSLOCACIÓN DE FOSFATIDÍLSERINA

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó la técnica de reducción de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), basada en la capacidad mitocondrial de transformar MTT en azul de formazán. Las células se incubaron con MTT (100 µM) durante 15 min, se lavaron y se extrajo el azul de formazán con DMSO (dimetil sulfóxido; 100%) que se leyó en el espectrofotómetro a 570 nm. La viabilidad celular también se determinó por la acumulación de calceína AM (Invitrogen, Molecular Probes) y exclusión de yoduro de propidio (IP) (Sigma) para teñir células vivas y muertas, respectivamente. Las células se incubaron con calceína (1 µM) por 15 min e IP (40 µM) por 5 min a 37 °C y las

células se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Diapho TMD) y se contaron las células teñidas con IP y calceína.

Para evaluar la translocación de fosfatidíserina a la capa externa de la membrana citoplasmática, como un parámetro de muerte apoptótica, se midió la unión de anexina-V conjugada con fluoresceína en las NGC cultivadas. Para esto, se empleó un Kit de anexina-V-FLUOS (Roche) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **5.3 INMUNOBLOTS**

Las NGC en cultivo se lavaron con PBS y se homogenizaron a 4 °C en una solución de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.4; NaCl 50 mM; los detergentes IGEPAL 2% y SDS [Dodecil sulfato de sodio] 0.2%; y un cóctel de inhibidores de proteasas [Complete, Roche]). Por su parte, ratas de 0, 4, 8, 12, 16 y 25 días postnatales (P0 a P25, respectivamente) se sacrificaron por decapitación y el cerebelo fue rápidamente removido en frío y homogenizado en el buffer de lisis mencionado arriba. Los homogenados de cerebelo obtenidos se sonicaron y centrifugaron a 1 000 g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se determinó la cantidad de proteína en los homogenados de células en cultivo y de tejido con el método de Bradford y las muestras se almacenaron a -20 °C.

Las proteínas de los homogenados, tanto celulares como de tejidos, se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés [PolyAcrylamide Gel Electrophoresis]; 12 ó 15%) y fueron transferidas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene fluoride; Immobilon-P, Millipore). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en una solución salina de Tris (TTBS; 100 mM Trizma, 150 mM NaCl, 0.1% Tween, pH 7.5) por 1h y posteriormente se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario de interés. Se utilizaron anticuerpos comerciales

dirigidos contra cIAP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:100); cIAP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:100); XIAP (BD Biosciencias Transduction Lab. dilución 1:250); survivina (NOVUS Biologicals, dilución 1:1000); AIF (Cell Signaling, dilución 1:1000); GAPDH (Millipore, dilución 1:2000); caspasa-3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:100); subunidad Vb del complejo citocromo oxidasa (Molecular Probes, dilución 1 µg/ml). Finalmente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado acoplado a fosfatasa alcalina; dirigido contra IgG de conejo (ZYMED, dilución 1:30000) o ratón (SIGMA, dilución 1:30000) durante 1h a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando un sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina (CDP-Star™, BioLabs, Inc.) y su exposición a una película (BioMax Light Film, Kodak Film). Los resultados obtenidos de los inmunoensayos fueron analizados densitométricamente con el programa ImageJ.

#### **5.4 ACTIVIDAD DE CASPASA-3 E INHIBICIÓN DE CASPASAS**

Las NGC en cultivo se lavaron con PBS y se homogenizaron a 4 °C en una solución de actividad de caspasas (HEPES 100 mM pH 7.5; sacarosa 10 %; EDTA 1 mM; EGTA 20 µM; el detergente CHAPS 0.2 %; el compuesto reductor DTT 10 mM; y un cóctel de inhibidores de proteasas [Complete, Roche] mezclado con glicerol (1:1). Se determinó la cantidad de proteína de los homogenados celulares con el método de Bradford. Para medir la actividad de caspasa-3 se empleó el sustrato fluorogénico acetyl-Asp-Glu-Val-Asp- $\alpha$ -(4-methylcoumaryl-7-amide) (Ac-DEVD-AMC; Peptides International). El sustrato se uso a una concentración final de 12.5 µM en 2.5 ml de solución de actividad de caspasas (que contenía solo el 10% de inhibidores de proteasas) y con un volumen de homogenado equivalente a 30 µg de proteína. La fragmentación del sustrato se determinó en un



espectrofluorómetro (RF-5301 PC, SHIMADZU), detectando la aparición de metilcoumarina (MCA) libre, con las longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 440 nm, respectivamente. La aparición de MCA se monitoreó durante 10 minutos y la actividad de caspasa-3 se expresa como incremento de fluorescencia ( $\Delta F$ ) por mg de proteína y por hora.

Para inhibir la actividad de caspasas, las NGC en cultivo se trataron a 1 ó 4 DIV con el inhibidor general de caspasas Q-VD-OPH (MP Biomedicals, LLC) a una concentración de 20  $\mu$ M, por los tiempos indicados y analizaron diferentes parámetros.

## **5.5 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL**

Las NGC cultivadas por los tiempos indicados se lavaron en frío con PBS y se removieron de la caja de cultivo en una solución con: HEPES 4 mM pH 7.4, sacarosa 0.32 M y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Se lisaron por sonicación y se centrifugaron por 10 min a 1000 x g. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 17500 x g por 20 min para obtener un botón correspondiente a la fracción mitocondrial. Todos los pasos se realizaron a 4 °C. La fracción mitocondrial fue disuelta en un pequeño volumen de la solución de lisis descrita en la sección 5.3.

## **5.6 INMUNOFLUORESCENCIA**

Las NGC se cultivaron sobre un cubreobjetos y a los tiempos indicados se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído (4% en PBS) por 20 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se permeabilizaron y se bloquearon con Tritón X-100 0.3% y suero normal de cabra 10% en PBS por 3h antes de la incubación con un anticuerpo policlonal de conejo específico a AIF o al fragmento activo

de caspasa-3 (ambos: Cell Signaling, dilución 1:100,) por toda la noche a 4 °C. Las células se incubaron por 1h a temperatura ambiente con un anticuerpo conjugado con fluoresceína dirigido a IgG de conejo (ZIMED, dilución 1:250). Después, las células se montaron con un medio especial para fluorescencia que contiene DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Inc) tiñendo así los núcleos para examinar la condensación nuclear. La fluorescencia de caspasa-3 se visualizó en un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200 M, Carl Zeiss) y se contaron las células positivas al fragmento activo de caspasa-3 y se expresó como el porcentaje del total de células. Por su parte, la fluorescencia de AIF fue examinada con un microscopio de laser confocal (Olympus Fluoview FV1000) y se contaron las células con localización nuclear de AIF y se expresó como el porcentaje del total de células.

## **5.7 INMUNOHISTOQUÍMICA**

Ratas de 0, 4, 8, 12, 16 y 25 días postnatales (P0 a P25, respectivamente) fueron anestesiadas con pentobarbital (100 mg/Kg de peso) y perfundidas a través del ventrículo izquierdo con PBS (a una presión de entre 0.75 a 2.5 ml/min, dependiendo de la edad) seguido por paraformaldehído (4% en PBS; a la misma presión que el PBS) a 4 °C. Los cerebros completos se disecaron, se postfijaron toda la noche con paraformaldehído al 4% a 4 °C, se crioprotegieron pasándolos por un gradiente (de menor a mayor concentración) de sacarosa (15 y 30%) en PBS, y los cerebelos se congelaron embebidos en el medio Tissue-Tek (Sakura Finetek U.S.A., Inc.). Se obtuvieron cortes sagitales de cerebelo de 35 µm de grosor que se almacenaron a -20 °C hasta su utilización para inmunohistoquímica.

Posteriormente, los cortes se bloquearon y permeabilizaron con suero normal de cabra 10% y Tritón X-100 0.5% en PBS por toda la noche a 4 °C, seguido por la incubación con el anticuerpo primario de interés por dos días a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos comerciales dirigidos contra cIAP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:50); cIAP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., dilución 1:50); XIAP (BD Biosciences Transduction Lab., dilución 1:50) o XIAP (Cell Signaling, dilución 1:50); survivina (NOVUS Biologicals, dilución 1:100); AIF (Cell Signaling, dilución 1:100). Los cortes se incubaron con anticuerpos acoplados a fluoresceína y dirigidos a IgG de conejo o de ratón (dependiendo del anticuerpo primario) (ambos de ZIMED, dilución 1:250), por 1h a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se montaron con un medio especial para fluorescencia que contiene DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Inc), tiñendo así los núcleos. La fluorescencia se visualizó en un microscopio de epifluorescencia (Axiovert 200 M, Carl Zeiss) o, especialmente en el caso de AIF, con un microscopio de laser confocal (Olympus Fluoview FV1000). Se contaron las neuronas con núcleos positivos a AIF por cada capa de la corteza cerebelar y se expresa como núcleos positivos por mm<sup>2</sup>.

## 5.8 INMUNOPRECIPITACIÓN

Para determinar la interacción de XIAP con la caspasa-3 activa, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Las NGC cultivadas por los tiempos indicados se lavaron dos veces en frío con PBS y homogenizaron a 4 °C en una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM; Tritón X-100 1% y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche)). Se cuantificó la cantidad de proteína de los homogenados obtenidos y se incubó 1 mg de proteína con 1 µg de anticuerpo dirigido contra XIAP (BD Biosciences Transduction Lab.) durante toda la noche a 4 °C en rotación. Posteriormente se agregó a

cada reacción 25  $\mu$ l de proteína G-agarosa (0.04 g/ml de solución de lisis) y se incubó por 2h a 4 °C en agitación. El complejo inmune se recuperó centrifugando a 300 rpm por 2 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón en solución de lisis. Se repitió este último proceso dos veces más para lavar el botón y finalmente la pastilla se desnaturizó y las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y la detección de XIAP y el fragmento activo de caspasa-3 se realizó con un inmunoensayo tipo Western blot como se indicó anteriormente.

## **5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos numéricos emanados de los diferentes ensayos se expresaron como el valor de la media  $\pm$  E.E.M. Para el análisis estadístico de los valores, a los datos se les aplicó la prueba estadística de t de dos muestras independientes. O bien, cuando el análisis se realizó para comparar más de dos muestras, se les aplicó a los valores una ANOVA de una vía seguida por las pruebas de Levene (para comparar las varianzas de la poblaciones) y de Tukey (para comparar las medias).

## VI. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividen en dos secciones. La primera (6.1) se refiere a la participación de AIF en la muerte neuronal tanto en NGC cultivadas crónicamente en condiciones no despolarizantes de bajo potasio (K5) como de neuronas durante el desarrollo postnatal del cerebelo. Los resultados emanados de esta parte del trabajo están incluidos en un artículo en prensa (6.1.1; *Blancas, S. y Morán, J. (2011). Role for Apoptosis-Inducing Factor in the Physiological Death of Cerebellar Neurons. Neurochem Int, 58 (8): 934-42.*

La segunda parte de los resultados de este trabajo (6.2) corresponde a los obtenidos acerca de la expresión de algunos miembros de la familia de las IAPs tanto en NGC cultivadas en condiciones despolarizantes (K25) como en la corteza cerebelar durante el desarrollo del cerebelo (manuscrito en preparación).

### 6.1 PAPEL DE AIF EN LA MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS CEREBELARES

Como ya se mencionó, hay numerosos estudios que muestran la participación de AIF en la muerte de NGC en cultivo bajo diferentes condiciones y que dicha participación puede ser dependiente o independiente de la actividad de caspasas. Sin embargo, no se ha explorado el papel de AIF en la muerte celular programada de NGC durante el desarrollo del cerebelo *in vivo* o en NGC cultivadas bajo condiciones que mimeticen dicho proceso, como es la privación crónica de alto potasio. De este modo, se analizó la expresión y localización intracelular de AIF tanto durante el desarrollo de la corteza

cerebelar como en cultivos primarios de NGC bajo condiciones de sobrevivencia y muerte celular (estos resultados se describen ampliamente en el apartado 6.1.1).

Cuando se midieron los niveles de AIF en el cerebelo durante el desarrollo postnatal de la rata, se observó la expresión de AIF en todas las edades analizadas con una tendencia a incrementar con el desarrollo. Dicho incremento es significativo a P12, comparado con los niveles observados a P0-4 (*Fig. 1 de artículo anexo* en 6.1.1). La translocación nuclear de AIF en la corteza cerebelar durante el desarrollo se identificó mediante ensayos de inmunohistoquímica (*Fig. 2 de artículo anexo* en 6.1.1). Se encontraron células en la corteza cerebelar con localización nuclear de AIF de manera dependiente de la edad (*Fig. 2 y Tabla 1 de artículo anexo* en 6.1.1). En la CGE se mantiene constante el número de células con núcleos positivos a AIF entre el estado perinatal (P0) y P16, pero hay un marcado incremento a P25. De manera contraria, en la CM se mantiene constante el número de células con núcleos positivos a AIF entre P0-P12 y se reduce hacia P16-P25. En la CP (presente a partir de P8), se observa una reducción de núcleos positivos a AIF a P25. En la CGI se encuentra una tendencia inicial de incrementar los núcleos positivos a AIF, con un máximo a P12, y una reducción hacia P25.

Por otro lado, la viabilidad de las NGC cultivadas crónicamente en K5 se reduce hacia los 5 DIV, pero no en las cultivadas en K25 o cultivadas en K5 solo por dos días y después en K25 (*Fig. 3A y B de artículo anexo* en 6.1.1). Bajo estas condiciones, los niveles totales de AIF se mantienen hasta los 7 DIV en K25, pero en K5 solo se mantienen a los 2-3 DIV y disminuyen a los 7 DIV, mientras que se restablecen en la NGC cultivadas en K5 por dos días y transferidas a K25 (*Fig. 3C de artículo anexo* en 6.1.1).

Se exploró la presencia de condensación nuclear en el proceso de muerte celular de las NGC en K5. De este modo, se observa un incremento de núcleos condensados

desde los 4 DIV con un pico a los 5-6 DIV (*Fig. 4A y D de artículo anexo en 6.1.1*). Asimismo, la muerte celular de las NGC inducida por K5, está acompañada por la liberación mitocondrial y translocación nuclear de AIF, a partir de los 5 DIV (*Fig. 4A, B y C de artículo anexo en 6.1.1*). La liberación mitocondrial de AIF es parcialmente inhibida por inhibidores generales de catepsinas, pero no de calpaínas (*Fig. 9*). Considerando que la condensación nuclear se observa desde los 4 DIV pero la translocación nuclear de AIF ocurre hasta los 5 DIV, se evaluó la participación de la caspasa-3 en la muerte neuronal inducida por K5. Con el uso de ensayos de inmunofluorescencia y fluorogénicos, se determinó que K5 induce la activación de la caspasa-3 desde los 4 DIV (*Fig. 5 de artículo anexo en 6.1.1*). Esto sugiere una correlación entre la actividad de la caspasa-3 y la condensación nuclear en la muerte celular inducida por K5.

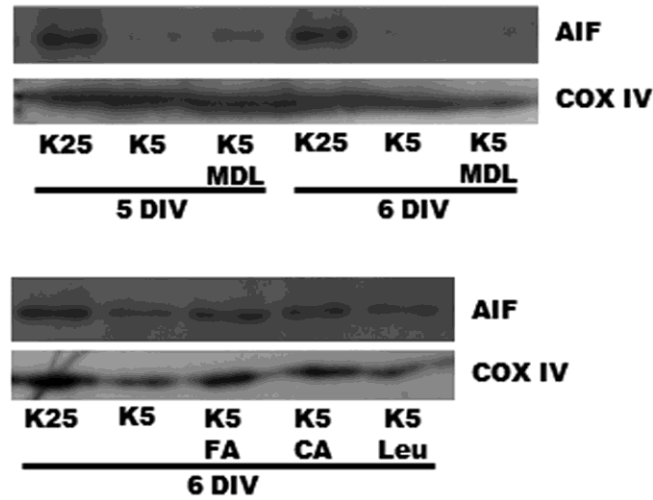
Para determinar si la activación de la caspasa-3 es responsable de la muerte de NGC inducida por K5, se exploró el efecto del inhibidor general de caspasas Q-VD-OPH (QVD) en la sobrevivencia de NGC cultivadas en K5. Se comprobó la efectividad del QVD midiendo la actividad de la caspasa-3 en las NGC cultivadas en K5 en presencia del inhibidor y se detecta una inhibición total de la caspasa, sin diferencia cuando el QVD se adiciona a 1, 3 o 4 DIV y se mide a 4, 5 ó 6 DIV (*Fig. 5C de artículo anexo en 6.1.1*). Cuando las NGC cultivadas en K5 se tratan a 1 ó 4 DIV con el QVD, se observa un incremento parcial de la viabilidad a los 5 y 6 DIV (el 13 y 20%, respectivamente), pero no a los 7 DIV (*Fig. 6A de artículo anexo en 6.1.1 y Fig. 10*).

Se examinó la translocación de la fosfatidílsarina, como marcador de muerte tipo apoptótica, con la tinción con Anexina-V e IP. Las NGC cultivadas en K5 muestran translocación de fosfatidílsarina (*Fig. 6B de artículo anexo en 6.1.1*) y este evento no se

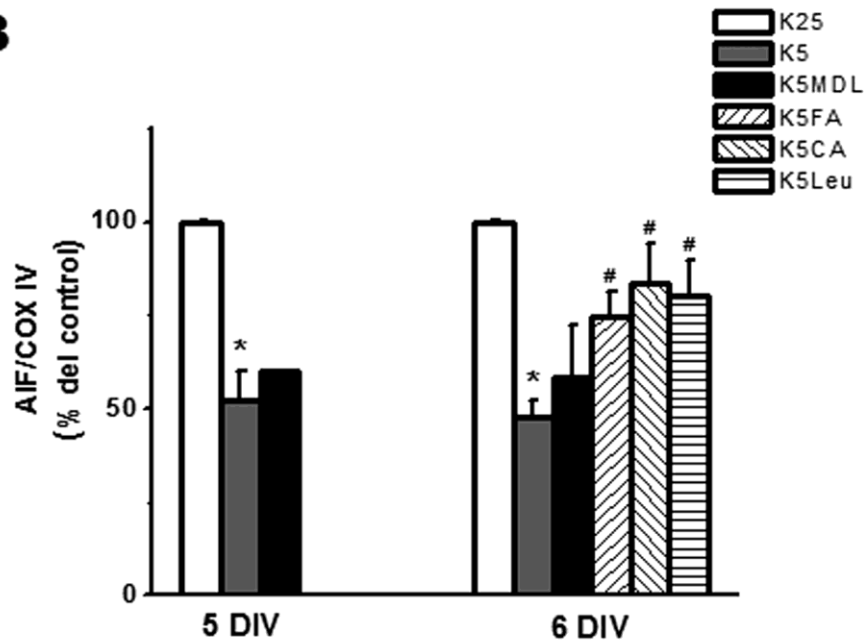
modifica por efecto del inhibidor de caspasas (*Fig. 6B de artículo anexo en 6.1.1*). Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones, las NGC sufren una muerte apoptótica independiente de caspasas. Considerando que el QVD muestra un efecto en la viabilidad a 6 DIV, se midió la translocación de AIF al núcleo a este tiempo. El tratamiento con QVD induce un incremento en la translocación de AIF al núcleo en estas neuronas (*Fig. 7A y C de artículo anexo en 6.1.1*). Consistente con el incremento observado en la viabilidad de NGC (*Fig. 6A de artículo anexo en 6.1.1*), el QVD induce una ligera reducción de la condensación nuclear de las NGC tratadas con K5 (*Fig. 7A y B de artículo anexo en 6.1.1*). Estos datos sugieren que el proceso de muerte de las NGC inducido por K5 es dependiente de caspasas, pero las NGC pueden alternativamente morir por un mecanismo apoptótico independiente de caspasas y mediado por AIF.



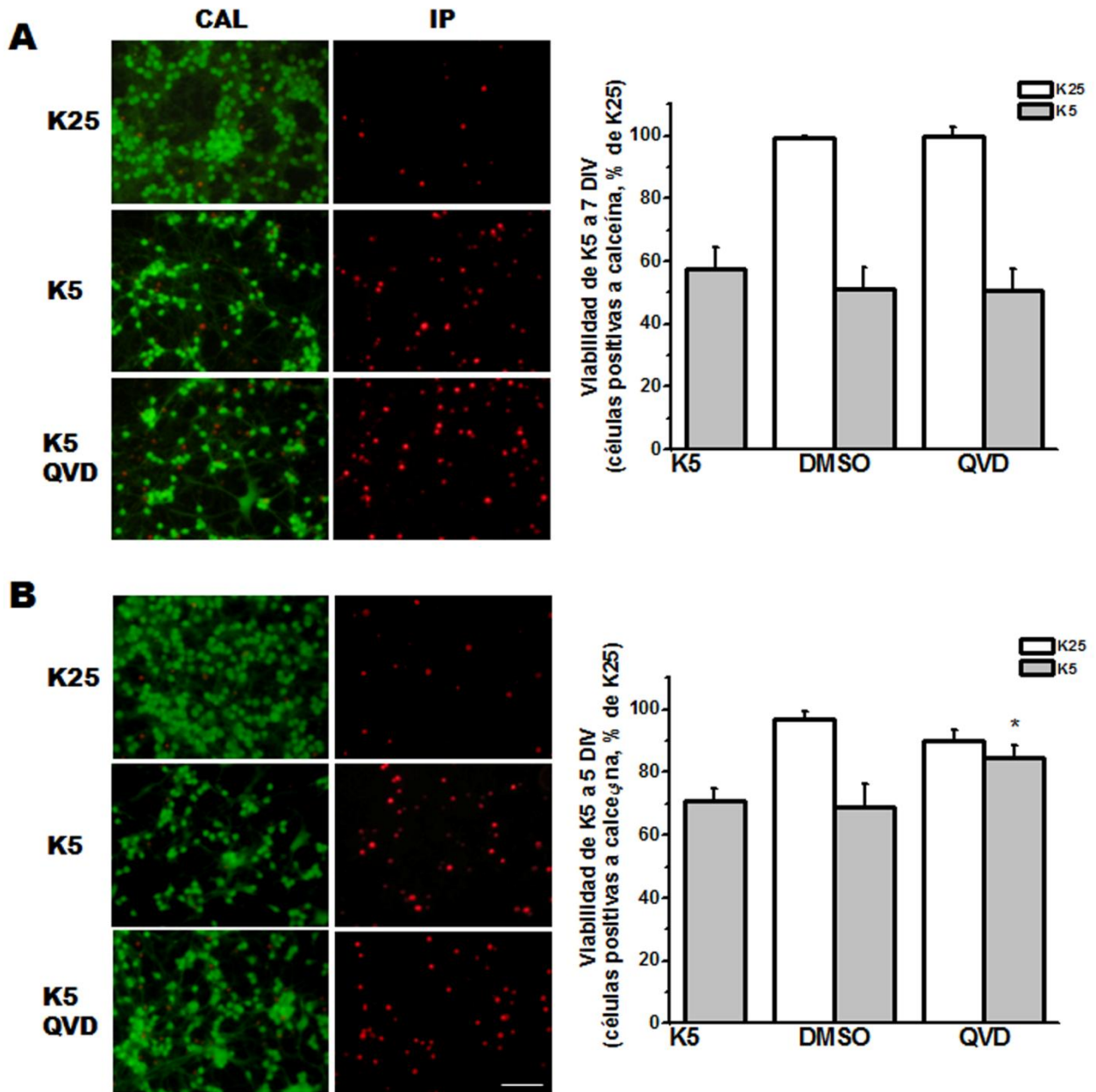
**A**



**B**



**Figura 9. Efecto de inhibidores de calpaínas y catepsinas en la liberación mitocondrial de AIF inducida por bajo potasio crónico en NGC.** Los niveles mitocondriales de AIF se midieron por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. A) Inmunoblot representativo de los niveles mitocondriales de AIF. Los niveles de la subunidad Vb de la Citocromo Oxidasa (COX IV) se usaron como control de carga. Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles mitocondriales de AIF de NGC cultivadas en K25 y K5 en presencia o ausencia del inhibidor de calpaínas MDL-28170 (50  $\mu$ M; MDL). Abajo: Inmunoblot representativo de los niveles mitocondriales de AIF de NGC cultivadas en K25 y K5 en presencia o ausencia de inhibidores de catepsinas: z-FA.fmk (50  $\mu$ M; FA), CA-074 (50  $\mu$ M; CA) o leupeptina (100  $\mu$ M; Leu). B) Análisis densitométrico de los inmunoblots en A. Los resultados se expresan como la relación AIF/COX IV, considerando a K25 de cada DIV como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de cuatro experimentos independiente. Los asteriscos indican significancia estadística *versus* K25 y # *versus* K5 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10. Efecto de la inhibición de caspasas en la viabilidad de NGC cultivadas crónicamente en potasio bajo.** Se midió la viabilidad, con calceína e IP como se describe en Procedimiento Experimental, de NGC cultivadas en K25 y K5 por 7 (A) o 5 DIV (B) y tratadas con QVD (20  $\mu$ M) o el vehículo (DMSO) a 1 DIV. Izquierda: Imágenes representativas de NGC bajo las condiciones indicadas. CF: contraste de fases; CAL: calceína; IP: yoduro de propidio. Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ M. Derecha: La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células positivas a calceína, considerando a K25 como 100%. En A, los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de ocho experimentos independiente. En B, los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de siete experimentos independiente. El asterisco indica significancia estadística *versus* K5 solo ( $p < 0.05$ ).

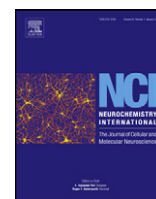
**6.1.1 Blancas, S. y Morán, J. (2011). Role for Apoptosis-Inducing Factor in the Physiological Death of Cerebellar Neurons. *Neurochem Int.*, 58 (8): 934-**

**42.** *El factor inductor de apoptosis (AIF) está implicado en la muerte apoptótica independiente de caspasas. El AIF liberado de la mitocondria se transloca al núcleo, donde éste regula algunos eventos apoptóticos así como la condensación de la cromatina y la degradación del DNA. En este trabajo se estudió el papel de AIF en la muerte neuronal bajo condiciones fisiológicas. Cuando analizamos la localización celular de AIF durante el desarrollo cerebelar, encontramos un incremento significativo en el número de neuronas con localización nuclear de AIF de manera dependiente de edad. Por otro lado, las neuronas granulares de cerebelo (CGN) cultivadas crónicamente en concentraciones bajas de potasio (5 mM; K5) mueren con características apoptóticas después de 5 días. En el presente estudio encontramos que K5 induce en las CGN una muerte apoptótica dependiente de caspasas así como una translocación nuclear tardía de AIF. Cuando la muerte de CGN inducida por K5 se llevó a cabo en presencia de un inhibidor general de caspasas, hubo una ligera reducción de la muerte celular, pero las neuronas eventualmente mueren mostrando características apoptóticas así como la translocación de fosfatidilserina y la condensación nuclear. Adicionalmente, hubo un incremento significativo en la translocación nuclear de AIF. Estos resultados soportan la idea de que AIF puede estar involucrada en la muerte apoptótica de CGN y que este puede ser un mecanismo alternativo de muerte neuronal durante el desarrollo del cerebelo.*



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurochemistry International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuint](http://www.elsevier.com/locate/neuint)

## Role for apoptosis-inducing factor in the physiological death of cerebellar neurons

Sugela Blancas, Julio Moran\*

Neuroscience Division, Institute of Cell Physiology, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 August 2010

Received in revised form 9 March 2011

Accepted 18 March 2011

Available online 4 April 2011

## Keywords:

Apoptotic-like death

AIF

Caspases

Cerebellum development

Cerebellar granule neurons

Potassium deprivation

## ABSTRACT

Apoptosis-inducing factor (AIF) is implicated in caspase-independent apoptotic-like death. AIF released from mitochondria translocates to the nucleus, where it mediates some apoptotic events such as chromatin condensation and DNA degradation. Here, the role of AIF in the neuronal death was studied under physiological conditions. When we analyzed the cellular localization of AIF during cerebellar development, we found a significant increase in the number of neurons with nuclear AIF localization in an age-dependent manner. On the other hand, cerebellar granule neurons (CGN) chronically cultured in low concentration of potassium (5 mM; K5) die with apoptotic-like characteristics after five days. In the present study we found that K5 induces a caspase-dependent apoptotic-like death of CGN as well as a late nuclear translocation of AIF. When CGN death induced by K5 was carried out in the presence of a general inhibitor of caspases, there was a slight decrement of cell death, but neurons eventually died by showing apoptotic-like features such as phosphatidylserine translocation and nuclear condensation. Besides, there was a significant increment of nuclear AIF translocation. These findings support the idea that AIF could be involved in apoptotic-like death of CGN and that it could be an alternative mechanism of neuronal death during cerebellar development.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Programmed cell death (PCD) is a physiologic and active process, involved in organogenesis during development (Krantic et al., 2007). Apoptosis is a type of PCD that plays an important role during maturation of the central nervous system (CNS). A deficit of apoptotic-like death during CNS development provokes a structural and functional disorganization in some areas of the brain (Kuida et al., 1996, 1998). Apoptosis can be defined by a series of morphological changes, including chromatin condensation, cytoplasmic shrinkage, zeiosis and the formation of apoptotic bodies, which is accompanied by a phosphatidylserine translocation. In the most classic form of apoptosis, the activation of caspases (aspartate-specific cysteine proteases) is observed (for review, see Leist and Jäätelä, 2001). The caspases activation cascade is associated with an activation of caspase activated DNase (CAD) that leads to a typical internucleosomal DNA fragmentation (for review, see Hengartner, 2000).

Apoptosis can also be mediated by a mechanism independent of caspases, in which the apoptosis-inducing factor (AIF) plays a

critical role. AIF is a mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent oxidoreductase that is anchored to the mitochondrial inner membrane by an amino-terminal transmembrane segment. In healthy cells, AIF plays roles in oxidative phosphorylation and redox control. After an apoptotic stimulus and mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), the transmembrane portion is cleaved by a cysteine protease, probably a calpain or cathepsin, to yield a soluble apoptogenic protein that is liberated into the cytosol (for review, see Joza et al., 2009; Hangen et al., 2010a). AIF is released from mitochondrial intermembrane space and translocates to the nucleus, where it mediates some apoptotic events such as chromatin condensation and large-scale (~50 kb) DNA degradation. AIF appears to be required for specific cell death pathways, mainly in response to DNA damage. Moreover, AIF may often function in a parallel pathway to caspases (for review, see Joza et al., 2009). There is evidence in *C. elegans*, that the down regulation of the AIF orthologue, WAH-1, results in a delay of PCD during embryogenesis (Wang et al., 2002). In early development of mouse, however, AIF seems not to be necessary for PCD during process of cavitation in embryoid bodies and neural tube closure (Brown et al., 2006) but its possible function is not known in other developmental events, such as programmed death of postmitotic neurons.

During cerebellar development, the external granule layer (EGL) gives rise to cerebellar granule neurons (CGN) (Ito, 1984). In rat, CGN proliferate in the EGL in the first two postnatal weeks (Altman, 1972). Postmitotic immature CGN migrate through the

\* Corresponding author at: División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-253, México 04510, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5622 5616; fax: +52 55 5622 5607.

E-mail addresses: [sblancas@ifc.unam.mx](mailto:sblancas@ifc.unam.mx) (S. Blancas), [jmoran@ifc.unam.mx](mailto:jmoran@ifc.unam.mx) (J. Moran).

molecular layer (ML) into the internal granule layer (IGL) between P3 and P21 (Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). Once in the IGL, these cells start receiving excitatory synaptic contacts from mossy fibers at around P5, and most of these synaptic contacts are functional from P10 to P12 (Arsenio-Núñez and Sotelo, 1985; Burgoyne and Cambray-Deakin, 1988). Along this process a considerable number of CGN die (Koppel et al., 1983) with characteristics of apoptosis-like (Wood et al., 1993; Alavez et al., 2006a, 2006b). It has been suggested, that the mossy fibers might exert a trophic effect over CGN during cerebellar development. This hypothesis is supported by the trophic effect of depolarization and the stimulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) of CGN in culture, which could mimic the trophic influences mediated *in vivo* by mossy fiber afferents on CGN (Gallo et al., 1987; Balázs et al., 1988a, 1988b).

Several studies have shown that CGN, obtained from P8 rats and cultured under physiological concentrations of potassium (5 mM KCl; K5) for more than 5 days *in vitro* (DIV) die with apoptotic-like characteristics (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2005). In contrast, the survival and differentiation of these cells in culture is markedly increased in the presence of high concentrations of potassium (25 mM KCl; K25) (Gallo et al., 1987; Balázs et al., 1988b; Morán and Patel, 1989a,b; Xifro et al., 2005) or NMDAR stimulation (Balázs et al., 1988a,b; Morán and Patel, 1989b; Xifro et al., 2005). During the last decade, cultured CGN have become a widely used model for the study of PCD (D'Mello et al., 1993; Morán et al., 1999; Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2005).

There are numerous studies showing the participation of AIF in CGN death upon several conditions. In this regard, it has been shown the contribution of calpain, one of the cysteine protease that release AIF, in CGN death induced by several conditions (Verdaguer et al., 2005; Diwakarla et al., 2009; Jantas and Lason, 2009; Ortega and Morán, 2010). On the other hand, previous studies have shown that during CGN death induced by oxidative stress (Fonfría et al., 2002) or hypoxic insults (Russell et al., 2007), AIF translocates to the nucleus in a caspase independent way; however, in some other cases, the participation of AIF seem to be dependent on caspase activity (Slagsvold et al., 2003; Diwakarla et al., 2009; Jantas and Lason, 2009). It has been suggested in different models that multiple pathways of cellular death frequently function in parallel (Kroemer et al., 2009; Nagley et al., 2010). Thus, caspase and AIF might operate simultaneously during neuronal death (for review, see Joza et al., 2009). Particularly, there is no available experimental evidence showing the role of AIF in the programmed death of CGN during cerebellar development *in vivo* or in CGN cultured under conditions that mimic the developmental process. In the present work, we studied the role of AIF in the mechanism of CGN death when cell are cultured chronically in K5 and during postnatal cerebellar development in an attempt to evaluate the participation of AIF during CGN death in the cerebellar development.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals and cell culture

Wistar rat pups at postnatal day 0, 4, 8, 12, 16 and 25 (P0 to P25, respectively) were obtained from our animal house at the Instituto de Fisiología Celular. Animals used for experimentation in this study were treated in accordance with procedures approved by the local Committee of Research and Ethics of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Protocols used followed the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research as well as the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

CGN were obtained as previously described (Morán and Patel, 1989a). Briefly, dissociated cell suspensions of 8-day-old Wistar rats cerebella were plated at a density of  $265 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in plastic dishes coated previously with poly-L-lysine (5 µg/ml) or in plastic dishes with glass coverslips using poly-L-lysine 25 µM. Culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml

penicillin. Culture dishes were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere, and cytosine arabinoside (10 µM) was added after 18 h. CGN were grown chronically on low (5 mM KCl; K5) or high potassium (25 mM KCl; K25). In some experiments cells were grown for two days in K5 and then cultures were treated with K25 until cells were harvested for their analysis at different days *in vitro* (DIV).

### 2.2. Cell viability and phosphatidylserine translocation

*In vitro* cell viability was estimated by using calcein AM (Invitrogen, Molecular Probes) and propidium iodide (PI) (Sigma) to stain living and dead cells, respectively. After treatment, cells were incubated with calcein (1 µM) for 15 min and PI (40 µM) for 5 min at 37 °C and cells were observed in an epifluorescence microscope (Nikon Diaphot TMD) and the number of stained cells with calcein and PI were counted. The number of cells counted was approximately 1000 cells for each independent observation.

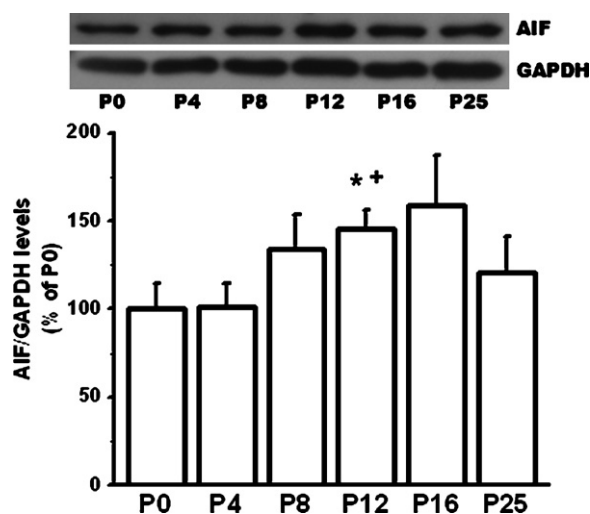
To evaluate the phosphatidylserine translocation to the extracellular side of the cytoplasmic membrane we measured the binding of Annexin-V-FLUOS (50 µM) in cultured CGN. For that, we used an Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations. The number of cells counted was approximately 300–500 cells for each independent observation.

### 2.3. Immunoblots

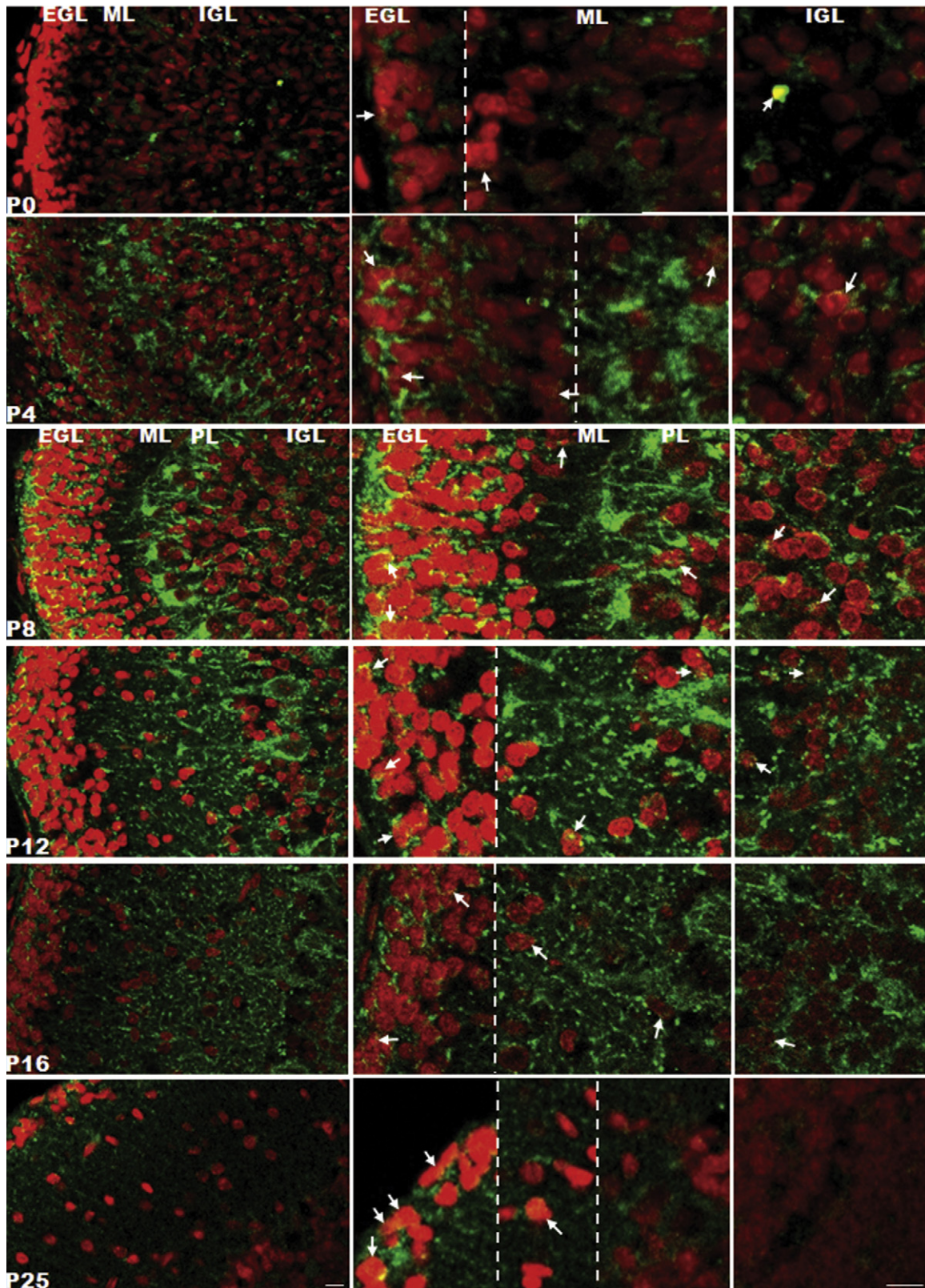
Cells were washed with PBS and fractioned (as mentioned below) or homogenized with lysis buffer (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, SDS 0.2% and Complete protease inhibitors (Roche), pH 7.4). Pups at different ages (P0–P25) were anesthetized with pentobarbital and decapitated. The cerebellum was dissected at 4 °C and the cerebella were washed with PBS and homogenized with lysis buffer. Protein concentration was quantified by the method of Bradford (Bradford, 1976). Homogenates and standard molecular weights (ProSive Color, Lonza) were separated in SDS-PAGE gels (12%) and transferred to a PVDF (Millipore, Immobilon) membrane. Blots were blocked with Tris-buffered saline (TBS; 100 mM Trizma, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing 5% nonfat dry milk for 1 h, washed with TBS (TBS with 0.1% Tween) and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody raised against AIF (1:1000 dilution, Cell Signaling) or GAPDH (1:2000 dilution, Millipore). After washing, blots were incubated with a secondary antibody coupled to alkaline phosphatase (anti-rabbit: 1:30,000 dilution, Zymed; anti-mouse: 1:30,000, SIGMA) for 1 h at room temperature. Blots were processed for visualization using an enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations (CDP-Star, BioLabs, Inc) and exposed to Kodak film. Densitometric analysis was done using the Image-J program, NIH Image.

### 2.4. Mitochondrial fraction isolation

Scraped cells were ruptured by sonication in 4 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.32 M sucrose. The homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 × g. The supernatant was centrifuged at 17,500 × g for 20 min to obtain a mitochondrial pellet. All steps were performed at 4 °C. Mitochondrial fraction was dissolved in a small volume of lysis buffer.



**Fig. 1.** Time course of AIF levels during cerebellar development. AIF levels were measured by Western blot at different postnatal days (0, 4, 8, 12, 16 and 25). Above: representative immunoblot of AIF levels. GAPDH was used as loading control; below: densitometric analysis of Western blots. Data are expressed as the percent of AIF levels at P0. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of five independent experiments. Asterisk and + indicate statistical significance versus P0 or P4, respectively ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Cerebellar localization of AIF during development. The distribution of AIF on cerebellar sagittal sections at different postnatal days (0, 4, 8, 12, 16 and 25) was measured by immunohistochemistry assays and nuclei were stained with DAPI as detailed in Section 2. Confocal images of developing cerebellum are shown; nuclei (DAPI) are shown in red and AIF in green. The two right columns are magnifications of the left column. In the images are indicated the layers of cerebellar cortex (EGL, ML, PL and IGL), PL is shown until P8, when it starts to be evident. Arrows indicate AIF positive nuclei. Scale bars correspond to 10 μm. EGL, external granule layer; ML, molecular layer; PL, Purkinje layer; IGL, internal granule layer.

2.5. Immunofluorescence

To visualize AIF in cultured neurons, cells were grown on glass coverslips rinsed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature and washed three times with PBS. Cells were permeabilized and blocked with 0.3% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS for 3 h before exposure to rabbit polyclonal antibody against AIF or cleaved caspase-3 (both: 1:100 dilution, Cell Signaling) overnight at 4 °C. Cells were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit antibody (1:250 dilution, ZIMED). Then, the stained cells were mounted with medium for fluorescence (Vectashield, Vector Laboratories, Inc) and nuclei were stained with DAPI (1.5 µg/ml) to examine nuclear condensation. Fluorescence was examined with a confocal laser-scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000) and cells with nuclear localization of AIF were counted and expressed as percent of the total cells. The number of cells counted was approximately 400–700 cells for each independent observation.

2.6. Immunohistochemistry

Pups at different ages (P0–P25) were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with PBS followed by 4% paraformaldehyde at 4 °C in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Whole brains were postfixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C, cryoprotected with increasing concentrations of sucrose (15 and 30%) in PBS, and cerebella were frozen in Tissue-Tek embedding medium (Sakura Finetek U.S.A., Inc.). Sagittal frozen sections (35 µm) were collected and stored at –20 °C until additional processing. Subsequently, sections were blocked and permeabilized in 10% normal goat serum and 0.5% Triton X-100 in PBS overnight at 4 °C, followed by incubation with rabbit polyclonal antibody against AIF (1:100 dilution, Cell Signaling) for two days at 4 °C. The primary antibody was detected with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:250 dilution, ZIMED) incubation for 1 h at room temperature. Slides were mounted with especial medium for fluorescence with DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Inc.). Sections were then examined under a confocal laser-scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000). The total amount of nuclei with AIF localization was counted by area of cortex layer of cerebellum and expressed as positive nuclei per mm<sup>2</sup>.

2.7. Caspase-3 activity

CGN were washed with PBS and then homogenized in a caspase activity buffer (100 mM HEPES, 10% (w/v) sucrose, 0.1% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA and complete protease inhibitors (Roche), pH 7.4). The homogenates were diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at –20 °C. Caspase-3 activity was assayed by a fluorometric method (Thornberry, 1994) in a spectrofluorophotometer (RF-5301 PC, SHIMADZU) using the tetrapeptide acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-α-(4-methylcoumaryl-7-amide) (Ac-DEVD-AMC; Peptides International) as substrate. The reaction was followed for 10 min after addition of substrate (12.5 µM) and cell homogenate (30 µg of protein) in the buffer for caspase with 10% of complete protease inhibitors. To inhibit caspase activity, cultured CGN were treated at 1 or 4 DIV with the general inhibitor of caspases Q-VD-OPH (MP Biomedicals, LLC) for the indicated times and different parameters were analyzed.

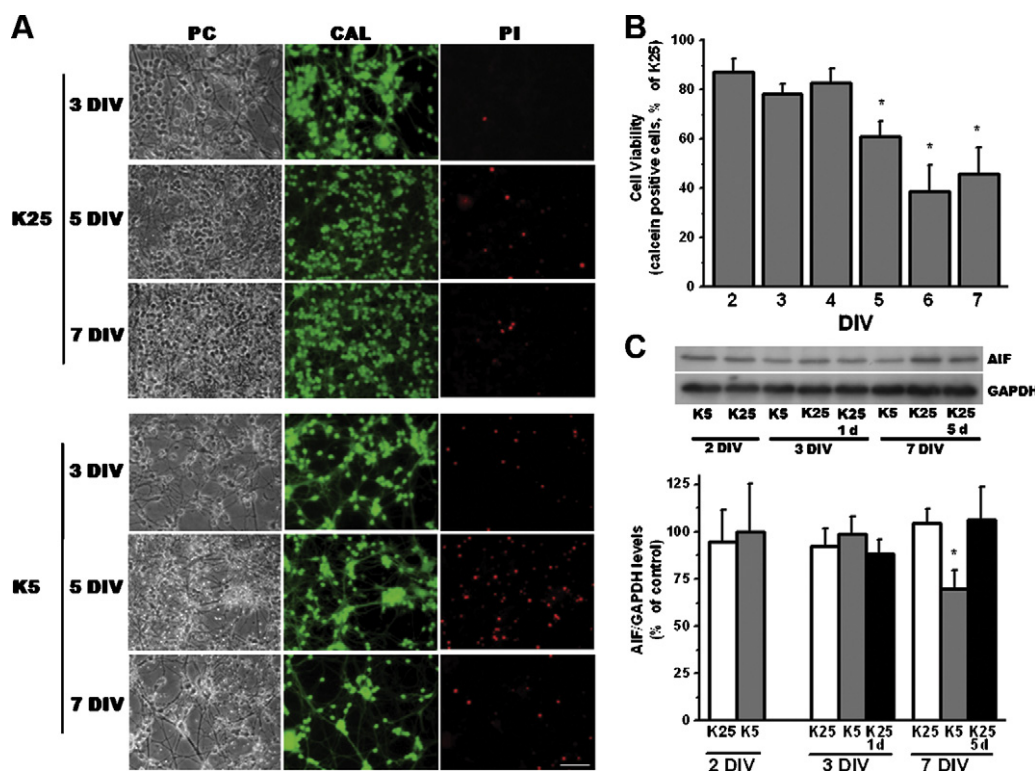
2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± S.E.M. values. Two sample *t*-Test or One-way ANOVA followed by Levene's test (for population variations) and Tukey tests was used for mean comparisons.

3. Results

3.1. Levels and translocation of AIF in developing cerebellum

We measured AIF levels in cerebella during postnatal development of rats. AIF levels are detectable at all times of cerebellar postnatal development (Fig. 1). Furthermore, AIF levels statistically increased at P12, compared to P0 and P4 levels, and this tendency is also observed at P8 and P16 (Fig. 1). As it is mentioned above, during development, the cerebellar cortex consist by external granule layer (EGL), molecular layer (ML), Purkinje layer (PL) and internal granule layer (IGL). We identified nuclear translocation of



**Fig. 3.** Cell viability and AIF levels of CGN cultured in chronic low potassium. The viability of CGN grown with K5 for the indicated times (A and B) was evaluated with calcein and propidium iodide at the indicated times as mentioned in Section 2. PC: phases contrast; CAL: calcein; PI: propidium iodide. Scale bar corresponds to 50 µm. In (B), cell viability is expressed as the percent of calcein positive cells considering K25 values as 100%. Values are mean ± S.E.M. of four independent experiments. Asterisks indicate statistical significance versus value at 2 DIV (*p* < 0.05). AIF levels (C) were measured by Western blot as detailed in Section 2. Above: representative immunoblot of AIF levels. GAPDH was used as loading control. At 3 and 7 DIV some cells grown in K5 were also treated with K25 during the last day (1d) or the last 5 days (5d). Below: densitometric analysis of Western blots. Results are expressed as the ratio AIF/GAPDH considering K5 at 2 DIV as 100%. Values are mean ± S.E.M. of six independent experiments. Asterisk indicates statistical significance between control (K25) and K5 (*p* < 0.05). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**  
AIF nuclear translocation on cerebellar development.

	EGL	ML	PL	IGL
P0	1171.37 ± 69.4	444.48 ± 71.0	NP	291.08 ± 28.4
P4	1291.57 ± 161.3	586.10 ± 71.0	NP	376.94 ± 38.5
P8	1139.02 ± 144.2	409.16 ± 43.2	519.43 ± 71.4	395.95 ± 25.9
P12	1526.73 ± 148.2	481.02 ± 62.6	744.67 ± 57.8	494.46 ± 52.1 <sup>†</sup>
P16	1701.27 ± 497.9	301.32 ± 25.5 <sup>  </sup>	610.71 ± 80.0	335.98 ± 47.9
P25	3006.47 ± 571.6 <sup>*,†,‡,§</sup>	175.75 ± 43.5 <sup>*,†,§</sup>	307.48 ± 98.5 <sup>§</sup>	51.65 ± 11.5 <sup>*,†,‡,§,†</sup>

Nuclei positive to AIF is expressed as positive nuclei for mm<sup>2</sup>. Values are mean + S.E.M. of four independent experiments.

<sup>\*</sup> Statistical significance against P0 ( $p < 0.05$ ).

<sup>†</sup> Statistical significance against P0 ( $p < 0.05$ ).

<sup>‡</sup> Statistical significance against P4 ( $p < 0.05$ ).

<sup>||</sup> Statistical significance against P4 ( $p < 0.05$ ).

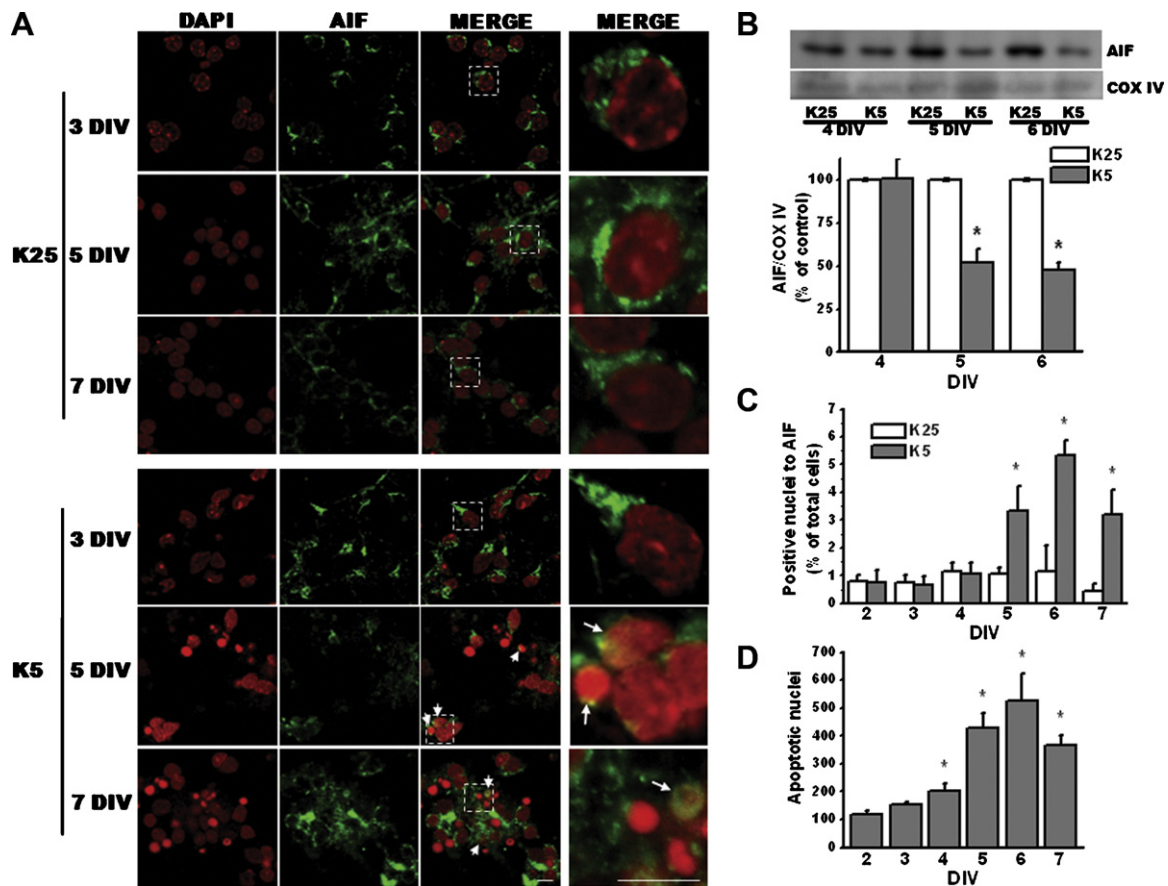
<sup>§</sup> Statistical significance against P8 ( $p < 0.05$ ).

<sup>§</sup> Statistical significance against P12 ( $p < 0.05$ ).

<sup>†</sup> Statistical significance against P16 ( $p < 0.05$ ).

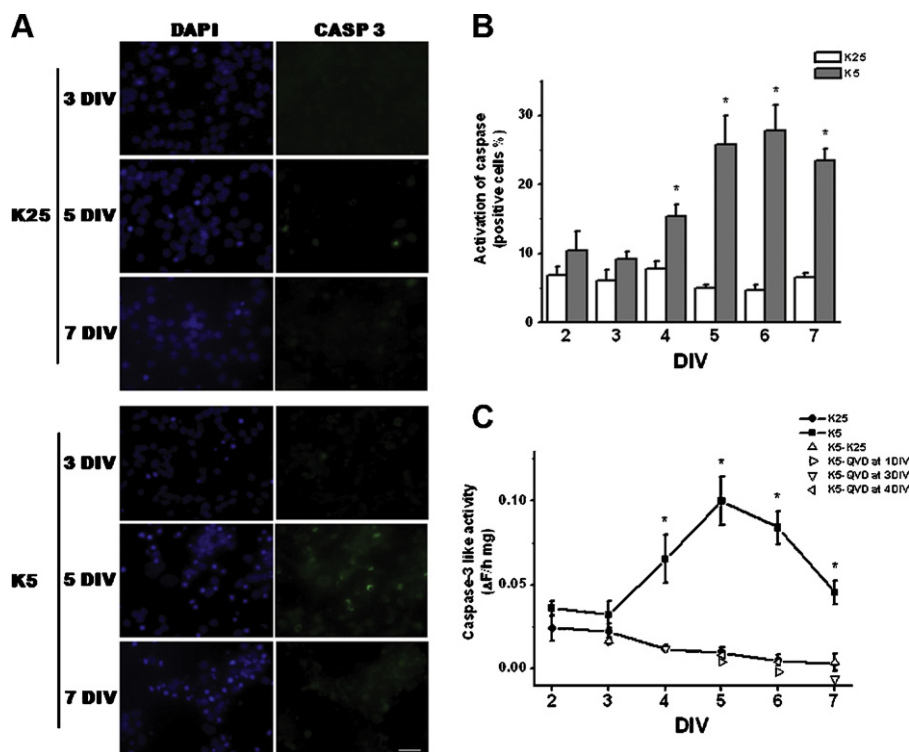
AIF by immunohistochemistry in nuclei of cerebellar sections taken at different postnatal days (Fig. 2). Under these conditions, we found cells with nuclear AIF localization in the cerebellar cortex in an age-dependent manner (Fig. 2 and Table 1). The number of cells with nuclear AIF localization in the EGL during cerebellar development is constant between the perinatal state (P0) and P16; however, there is a marked increment at P25. Conversely, in the ML the number of these cells is constant between P0 and P12 and there

is a decrease at P16 and P25. Similarly to ML, in the PL, which is present in cerebellum from P8, there is a reduction of cells showing AIF translocation at P25. Finally, in the IGL there is also a tendency to increase AIF nuclear localization reaching a maximum at P12, when there is a decrease until P25. The number of nuclei positive to AIF is no higher than 10% at all ages and layers evaluated. For example, in the EGL, ML, PL and IGL it represented about 2.5%, 6%, 3% and 1% of total cells, respectively.



**Fig. 4.** Apoptotic-like death and AIF release and nuclear translocation of CGN induced by chronic low potassium. The mitochondrial levels of AIF and its cellular distribution were measured by Western blot (B) and immunofluorescence assays (A and C), and nuclei were stained with DAPI (A and D) as detailed in Section 2. Confocal images of CGN cultured in K25 or K5 at the indicated times are shown in (A). The photographs on the right column are magnification of the white square shown in MERGE; arrows indicate AIF positive nuclei. Scale bars correspond to 5  $\mu$ m. In (B), representative immunoblot of mitochondrial AIF levels and the subunit Vb of Cytochrome Oxidase (COX IV) used as loading control. Below: densitometric analysis of Western blots. Results are expressed as the ratio AIF/COX IV, considering K25 as 100% for each DIV. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Asterisk indicates statistical significance between control (K25) and K5 ( $p < 0.05$ ). In (C), bars show the AIF positive nuclei expressed as the percent of total cells. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Asterisks indicate statistical significance between control (K25) and K5 ( $p < 0.05$ ). In (D), bars indicate apoptotic-like cells expressed as the percent of condensed nuclei considering K25 as 100%. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of ten independent experiments. Asterisks indicate statistical significance versus value at 2 DIV ( $p < 0.05$ ).





**Fig. 5.** Caspase-3 activation induced by chronic low potassium in CGN. Caspase-3 activation was measured by immunofluorescence assays (A and B) and by a fluorogenic substrate (C) as detailed in Section 2. Representative images of active caspase-3 (CASP 3) in CGN cultured with K25 or K5 for the indicated times are shown in (A). Scale bar corresponds to 20  $\mu\text{m}$ . In (B), the number of positive cells to active caspase-3 is expressed as the percent of total cells per field. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments. Asterisks indicate statistical significance between control (K25) and K5 ( $p < 0.05$ ). In (C), caspase-3 activity is expressed as the delta of fluorescence per mg of protein. Symbols correspond to:  $\bullet$ , K25;  $\blacksquare$ , K5;  $\triangle$ , cells grown in K5 for two days and treated with K25 during the last 5 days;  $\nabla$ , cells grown in K5 and treated with QVD at 1 DIV;  $\triangleleft$ , cells grown in K5 and treated with QVD at 3 DIV;  $\triangleleft$ , cells grown in K5 and treated with QVD at 4 DIV. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of seven independent experiments. Asterisks indicate statistical significance between control (K25) and K5 ( $p < 0.05$ ). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.2. Effect of K5 on viability and AIF levels of cultured CGN

When CGN were cultured in a K25 medium, no change in cell viability was observed after 7DIV (Fig. 3A). In contrast, CGN cultured in K5 significantly diminished calcein-positive cells and increased PI labeled cells after 5 DIV. Before 2–4 DIV, no appreciable change in CGN viability was observed (Fig. 3A and B). Under these conditions, the total AIF levels decreased at 7 DIV, but not at 2 and 3 DIV (Fig. 3C). When CGN were treated with K5 only for 2 days and then cultured with K25 for 5 more days (K25, 5d), both cell viability (data not shown) and AIF levels were completely restored to control levels (Fig. 3C). Relative AIF levels under K25 conditions do not change from 2 to 7 DIV (Fig. 3C).

### 3.3. Effect of K5 on AIF translocation, nuclear condensation and caspase-3 activation of cultured CGN

Fig. 4 shows K5-induced mitochondrial release and nuclear translocation of AIF in CGN. Nuclear translocation was observed only after 5 DIV (Fig. 4A and C). AIF translocation was not observed in K25 at any time tested (Fig. 4A and C). Consistent with the nuclear translocation data, we observed a significant mitochondrial release of AIF induced by K5 after 5 DIV, but not at 4 DIV (Fig. 4B). This release was partially inhibited by general cathepsin inhibitors, but not by a calpain inhibitor (Supplementary Fig. 1). We also evaluated the nuclear condensation by fluorescence; we found that it is increased by K5 from 4 DIV with a marked raise at 5–6 DIV (Fig. 4A and D). It is interesting to note that both nuclear condensation and AIF translocation induced by K5 exhibited a similar time course (Fig. 4), except at 4 DIV when there was only a slight increase in nuclear condensation without AIF translocation.

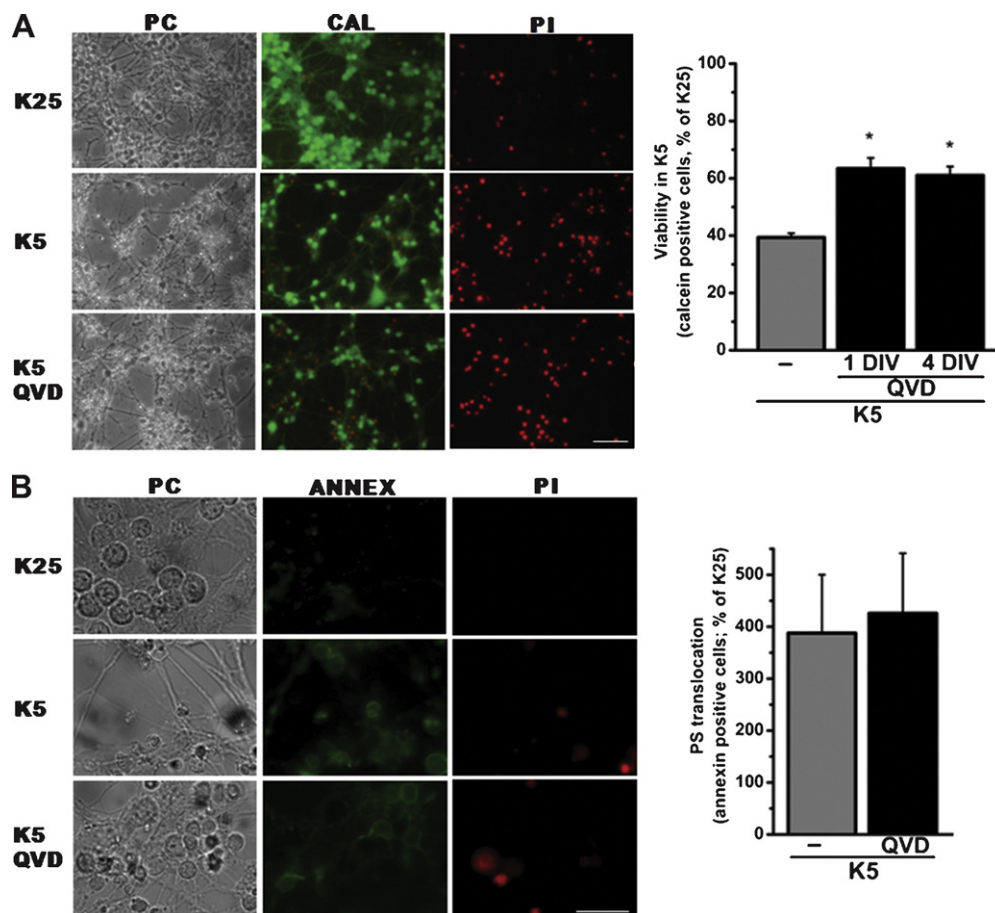
In order to evaluate the participation of caspase-3 in the nuclear condensation observed with K5, we measured the activation of caspase-3 induced by K5 at different times using immunofluorescent (Fig. 5A and B) and fluorogenic assays (Fig. 5C). In both cases we found that K5 induced the activation of caspase-3 from 4 DIV, but not at 2 and 3 DIV (Fig. 5). These results suggest a possible correlation between caspase-3, nuclear condensation and cellular death induced by K5.

### 3.4. Effect of caspases inhibition on viability of CGN

To test if caspase-3 activation is responsible for CGN death induced by K5, we used a general inhibitor of caspases, Q-VD-OPH (QVD). CGN cultured in K5 were treated at 1 or 4 DIV with QVD and cell viability was measured at 5, 6 and 7 DIV. Under these conditions we found that QVD did not rescue CGN from death at 7 DIV (Supplementary Fig. 2A). In contrast, there was an effect of QVD on the CGN viability at 5 and 6 DIV, when QVD partially (by 13 and 20%, respectively) rescued CGN from cell death induced by K5 (Fig. 6A and Supplementary Fig. 2B). No differences were observed in caspases activity when QVD was added at 1, 3 or 4 DIV and measured at 4, 5, 6 or 7 DIV (Fig. 5C).

### 3.5. Effect of caspase inhibition on AIF translocation and apoptotic-like death induced by K5

We explored some apoptotic-like parameters to evaluate the type of cell death of CGN induced by K5. We found, by using Annexin V-PI staining, that CGN treated with K5 showed phosphatidylserine translocation (Fig. 6B), which confirms apoptotic-like death induced by these conditions. The observed



**Fig. 6.** Effect of caspase inhibition on cell viability and phosphatidylserine (PS) translocation in CGN cultured in chronic low potassium. The viability of CGN cultured in K5 for 6 DIV and treated with QVD (20  $\mu$ M) at 1 or 4 DIV was measured with calcein and propidium iodide as mentioned in Section 2 (A). Left: representative image of calcein/PI stain of CGN treated with QVD at 1 DIV; PC: phases contrast; CAL: calcein; PI: propidium iodide. Scale bar corresponds to 50  $\mu$ m. Right: cell viability is expressed as the percent of calcein positive cells considering K25 as 100%; bars corresponds to viability of CGN grown in K5 without (gray bar) or with 20  $\mu$ M QVD (black bars) added at 1 DIV or 4 DIV. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of 6 independent experiments. Asterisks indicate statistical significance versus K5 ( $p < 0.05$ ). In (B), the translocation of PS was evaluated at 6 DIV by using Annexin-V-FITC (ANNEX) and propidium iodide (PI) stain as mentioned in Section 2. Left: representative images of Annexin and PI stain of CGN treated with 20  $\mu$ M QVD at 1 DIV; PC: phases contrast. Scale bar corresponds to 20  $\mu$ m. Right: PS is expressed as the percent of K25 of cells grown with K5 without (gray bar) or with QVD (black bar). Values are mean  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

phosphatidylserine translocation was not modified in the presence of the caspase inhibitor QVD (Fig. 6B). These results suggest that under these conditions, CGN could undergo a caspase-independent apoptotic-like death. Considering that QVD showed an effect on CGN viability at 5 and 6 DIV, we measured the AIF translocation to the nucleus at this time. The treatment with QVD induced an increment of AIF translocation in these neurons (Fig. 7A and C). Consistent with the observed increase in CGN viability (Fig. 6A), QVD induced a slight reduction of nuclear condensation of CGN treated with K5 (Fig. 7A and B). These data suggest that the death process of CGN induced by K5 is caspase-dependent, but CGN can alternatively die by a caspase-independent apoptotic-like mechanism mediated by AIF.

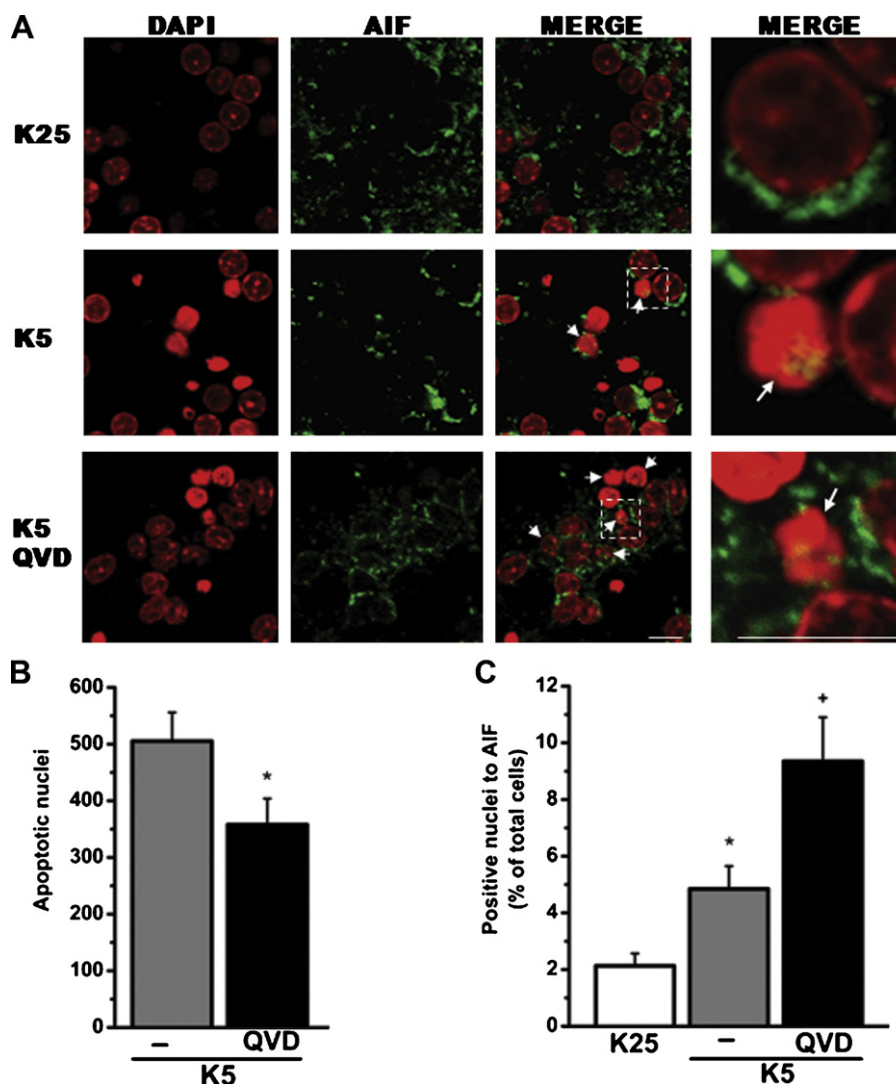
#### 4. Discussion

It is known that CGN chronically cultured with low concentrations of potassium die with apoptotic-like characteristics (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2005), including nuclear condensation and caspases activation. On the other hand, it has not been elucidated the role of AIF under these conditions. Here, we corroborated that CGN chronically cultured in K5 die at 5 DIV. No positive correlation was found between CGN death and total AIF levels, which showed a marked reduction at 7 DIV. These results could suggest that AIF is related to survival rather than to cell death. In this regard, it has

been proposed that AIF has a dual function: apart from its role in cell death it could be important to maintain the oxidative phosphorylation and therefore the cell survival (Vahsen et al., 2004; Hangen et al., 2010b). In addition, in Harlequin mice, which have an 80% reduction in AIF expression (Klein et al., 2002), the cerebellum shows a progressive loss of neurons, including CGN. Furthermore, in embryonic conditional AIF-null CGN and Purkinje mice, neuronal precursors show a reduced survival and proliferation (Ishimura et al., 2008).

Based on this information it is possible that AIF could be a survival factor in CGN chronically cultured in K5 during the first days in culture, when AIF levels are relatively high before the process of cell death begins. However, additional data are needed to demonstrate this suggestion. It is interesting to note that even when the high levels of AIF were detected, no nuclear translocation was observed during the first 4 DIV. After this time, AIF is decreased and then it occurs a nuclear translocation, which has been shown to be necessary for its proapoptotic function (for review, see Joza et al., 2009; Hangen et al., 2010a). Then, AIF could have a proapoptotic action at this time.

In this work, we confirmed the apoptotic-like characteristic of CGN death under chronic K5, including nuclear condensation, caspase-3 activity and phosphatidylserine translocation. There was a temporal correlation between nuclear condensation and caspase-3 activity at 4 DIV. Besides, we also found mitochondrial



**Fig. 7.** Effect of caspases inhibition on nuclear condensation and AIF nuclear translocation in CGN cultured in chronic low potassium. The cellular distribution of AIF was measured by immunofluorescence and nuclei were stained with DAPI. In (A), confocal images of CGN cultured in K25 or K5 for 6 DIV and treated with QVD (20  $\mu$ M) at 1 DIV. The photographs on the right column are magnifications of the white squares shown in MERGE; arrows indicate AIF positive nuclei. Scale bars correspond to 5  $\mu$ m. In (B), bars indicate apoptotic-like cells expressed as the percent of condensed nuclei considering K25 as 100% of CGN cultured with or without 20  $\mu$ M QVD. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of nine independent experiments. Asterisk indicates statistical significance versus K5 alone ( $p < 0.05$ ). In (C), positive nuclei to AIF are expressed as the percent of total cells; bars correspond to CGN cultured with K25 or K5 with or without QVD. Values are mean  $\pm$  S.E.M. of ten independent experiments. Asterisk indicates statistical significance versus K25; + indicates statistical significance versus K5 ( $p < 0.05$ ).

release and nuclear translocation of AIF after 5 DIV. The number of cells with nuclear AIF translocation was lower than those showing active caspase-3. Additionally, we observed that cathepsin, but not calpain inhibitors significantly reduced the mitochondrial AIF release. This suggests that, in this model, the mitochondrial AIF release depends on cathepsins, but not calpains, which are known to play a role in AIF release in CGN death induced by other conditions (for review, see Joza et al., 2009; Hangen et al., 2010a).

Due to the fact that at 4 DIV no AIF translocation occurs, we can conclude that AIF was not responsible for the apoptotic-like nuclear morphology observed at this time. These results suggest that apoptotic-like death is largely mediated by a caspase-dependent process and that there is also an apoptotic-like death process mediated by AIF under these conditions. It is possible that there is a sub-population of cells dying by a mechanism dependent on caspases and other mediated by AIF. Alternatively, it is also possible that both mechanisms could be occurring in the same cell. In this regard, it is now well accepted that multiple pathways frequently operate in parallel during neuronal death (Kroemer

et al., 2009; Nagley et al., 2010), particularly in the case of caspase-dependent death and cell death mediated by AIF (Joza et al., 2009).

The possibility of AIF involvement in apoptotic death as an alternative mechanism of death is supported by our observations showing that caspases inhibition did not completely reduce CGN death or the apoptotic parameters, including phosphatidylserine translocation. The possibility that cell death could be regulated by AIF under conditions of caspase inhibition was supported by the marked increase of AIF translocation to the nucleus. It has been reported that AIF induces chromatin condensation around the nuclear membrane that corresponds to stage I chromatin condensation of nuclear apoptotic morphology (Yuste et al., 2005). Moreover, during caspase inhibition there was an initial reduction of cell death that eventually disappeared and at 7 DIV the proportion of CGN dead was the same in the presence or absence of caspase inhibition.

We also observed an increment of AIF levels during cerebellar development, particularly at P12, probably due to the increment of cell number in the EGL. When we analyzed the cellular localization of AIF in these animals we found a significant number of neurons

with AIF localized in their nuclei in an age-dependent manner. The observed increase in the amount of nuclear AIF-positive cells in the IGL at P12 could be related to the massive death process of CGN that occurs during the migration (from EGL to IGL) and synaptogenesis of CGN (Koppel et al., 1983). On the other hand, the observed decrease of the amount of these nuclear AIF-positive cells in the ML and PL, at P16–P25 and P25 respectively, can be associated with the decline of massive death process in these layers, which occurs during second postnatal week (White and Barone, 2001; Alavez et al., 2006b). Finally, the increment of neurons with positive nuclei to AIF in the EGL at P25 could be related to the disappearance of this layer at this age.

In summary, we suggest that apoptotic-like death of CGN under *in vitro* and *in vivo* conditions could be mediated mainly by caspases, although a proportion of cell death might be mediated by AIF. In addition, the intrinsic program of CGN death *in vitro* mediated by caspases could be switched to an alternative mechanism involving AIF.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez for the excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN218310) and CONACYT (79788). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Sugela Blancas at the Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a CONACYT fellowship.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neuint.2011.03.017.

### References

- Alavez, S., Blancas, S., Morán, J., 2006a. Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398, 241–245.
- Alavez, S., Blancas, S., Morán, J., 2006b. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on caspase activation and neuronal death in the developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 404, 176–181.
- Alavez, S., Pedroza, D., Morán, J., 2003. Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem. Int.* 43, 581–590.
- Altman, J., 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.* 145, 465–514.
- Arsenio-Núñez, M.L., Sotelo, C., 1985. Development in the spino cerebral system in the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.* 237, 291–306.
- Balázs, R., Hack, N., Jorgensen, O.S., 1988a. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 87, 80–86.
- Balázs, R., Jorgensen, O.S., Hack, N., 1988b. N-Methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* 27, 437–451.
- 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.
- Brown, D., Yu, B.D., Joza, N., Benit, P., Meneses, J., Firpo, M., Rustin, P., Penninger, J.M., Martin, G.R., 2006. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9918–9923.
- Burgoyne, R., Cambray-Deakin, M., 1988. The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res. Rev.* 13, 77–101.
- Diwakarla, S., Nagley, P., Hughes, M.L., Chen, B., Beart, P.M., 2009. Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 156–1572.
- D'Mello, S.R., Gallii, C., Ciotti, T., Calissano, P., 1993. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10989–10993.
- Fonfría, E., Daré, E., Benelli, M., Suñol, C., Ceccatelli, S., 2002. Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2013–2016.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R., Jorgensen, O.S., 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7, 2203–2213.
- Hangen, E., Blomgren, K., Bénit, P., Kroemer, G., Modjtahedi, N., 2010a. Life with or without AIF. *Trends Biochem. Sci.* 35, 278–287.
- Hangen, E., De Zio, D., Bordin, M., Zhu, C., Dessen, P., Caffin, F., Lachkar, S., Perfettini, J.L., Lazar, V., Benard, J., Fimia, G.M., Piacentini, M., Harper, F., Pierron, G., Vicencio, J.M., Bénit, P., de Andrade, A., Höglinger, G., Culmsee, C., Rustin, P., Blomgren, K., Ceconi, F., Kroemer, G., Modjtahedi, N., 2010b. A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. *Cell Death Differ.* 17, 1155–1166.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776.
- Ishimura, R., Martin, G.R., Ackerman, S.L., 2008. Loss of apoptosis-inducing factor results in cell-type-specific neurogenesis defects. *J. Neurosci.* 28, 4938–4948.
- Ito, M., 1984. Cerebellar granule cells. In: Ito, M. (Ed.), *The Cerebellum and Neural Control*. Raven Press, New York, pp. 74–85.
- Jantas, D., Lason, W., 2009. Different mechanisms of NMDA-mediated protection against neuronal apoptosis: a stimuli-dependent effect. *Neurochem. Res.* 34, 2040–2054.
- Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., Kroemer, G., 2009. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171, 2–11.
- Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., Ackerman, S.L., 2002. The harlequin mouse mutation down-regulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367–374.
- Koppel, H., Lewis, P.D., Patel, A.J., 1983. Cell death in the early granular layer of normal and undernourished rats: further observations, including estimates of rate of cell loss. *Cell Tissue Kinet.* 16, 99–106.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R., 2007. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog. Neurobiol.* 81, 179–196.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Núñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovskiy, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S.S., Rakic, P., Flavell, R.A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325–337.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A., 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368–372.
- Leist, M., Jäättelä, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589–598.
- Morán, J., Itho, T., Reddy, U.R., Chen, M., Alnemri, E., Pleasure, D., 1999. Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73, 568–577.
- 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., Patel, A.J., 1989b. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* 486, 15–25.
- Nagley, P., Higgins, G.C., Atkin, J.D., Beart, P.M., 2010. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 167–185.
- Ortega, A., Morán, J., 2010. Role of cytoskeleton proteins in the morphological changes during apoptotic cell death of cerebellar granule neurons. *Neurochem. Res.* doi:10.1007/s11064-010-0269-1.
- Russell, J.C., Blue, M.E., Johnston, M.V., Naidu, S., Hossain, M.A., 2007. Enhanced cell death in MeCP2 null cerebellar granule neurons exposed to excitotoxicity and hypoxia. *Neuroscience* 150, 563–574.
- Slagsvold, H.H., Rosseland, C.M., Jacobs, C., Khuong, E., Kristoffersen, N., Gaarder, M., Fallgren, A.B., Huitfeldt, H.S., Paulsen, R.E., 2003. High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 984, 111–121.
- Thornberry, N.A., 1994. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol.* 244, 615–631.
- Vahsen, N., Candé, C., Brière, J.J., Bénit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schägger, H., Rustin, P., Kroemer, G., 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23, 4679–4689.
- Verdaguer, E., Alvira, D., Jiménez, A., Rimbau, V., Camins, A., Pallàs, M., 2005. Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons. *Br. J. Pharmacol.* 145, 1103–1111.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., Xue, D., 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587–1592.
- White, L.D., Barone Jr., S., 2001. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ.* 8, 345–356.
- Wood, K.A., Dipasquale, B., Youle, R.J., 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 612–632.
- Xifro, X., Malagelada, C., Miñano, A., Rodríguez-Alvarez, J., 2005. Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 21, 827–840.
- Yuste, V.J., Sánchez-López, I., Solé, C., Moubarak, R.S., Bayascas, J.R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S.A., Comella, J.X., 2005. The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 35670–35683.

## **6.2 PAPEL DE LAS IAPs EN LA SOBREVIVENCIA DE NGC Y CÉLULAS CEREBELARES**

Los resultados emanados de esta parte del trabajo forman parte de un artículo en preparación (Blancas, S. y Morán, J. 2011. *Role for Members of IAPs in Survival of Cerebellar Neurons*).

### **6.2.1 Niveles de IAPs en el cerebelo durante el desarrollo postnatal**

Mediante ensayos tipo Western Blot se determinaron los niveles endógenos de las IAPs en homogenados totales de cerebelo obtenidos de ratas a diferentes edades postnatales: 0, 4, 8, 12, 16 y 25. Se observa la expresión basal de todas las IAPs analizadas (cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina) en los homogenados de cerebelo de todas las edades estudiadas pero con niveles de expresión diferencial entre las diferentes proteínas, durante el desarrollo postnatal del cerebelo.

Las cIAPs muestran niveles de expresión diferencial en el cerebelo durante su desarrollo postnatal. La cIAP-1 no muestra cambios significativos en sus niveles durante el desarrollo del cerebelo; se observa una ligera disminución en los niveles de esta IAP a P4-8 pero que se recuperan hacia P12, manteniéndose sin cambios (Fig. 11 A). Por su parte, la cIAP-2 presenta una clara tendencia a disminuir con la edad del animal, encontrándose los niveles más altos perinatalmente (P0). Se observa la disminución estadísticamente significativa de esta proteína a partir de P12, P16 y P25 con respecto a P0, P4 y P8, respectivamente (Fig. 11 B).

Por el contrario, los niveles de XIAP incrementan durante el desarrollo del cerebelo de la rata, con diferencias significativas hacia P16-25 con respecto a P0 y P8 (Fig. 12 A). En el caso de la survivina, se observa una disminución estadísticamente significativa en

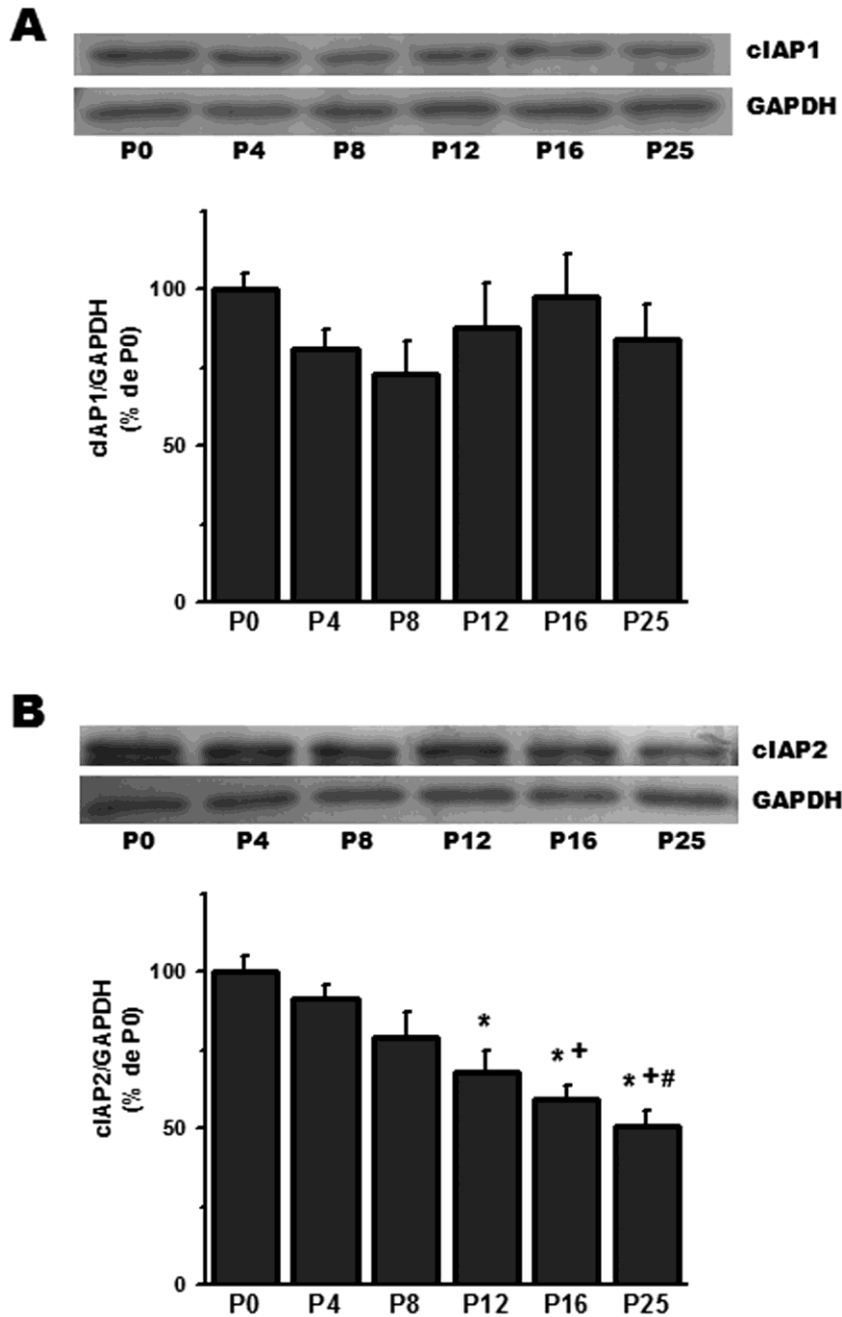
los niveles de esta IAP hacia P25, comparado con todas las edades previas estudiadas (Fig. 12 B).

Estos resultados sugieren que hay un patrón diferencial de expresión, durante el desarrollo postnatal del cerebelo, de los diferentes miembros de la familia de las IAPs analizados en este trabajo. Destacando los casos opuestos de la cIAP-2 y de la XIAP en cuanto a que una disminuye y la otra incrementa, respectivamente, durante el desarrollo del cerebelo.

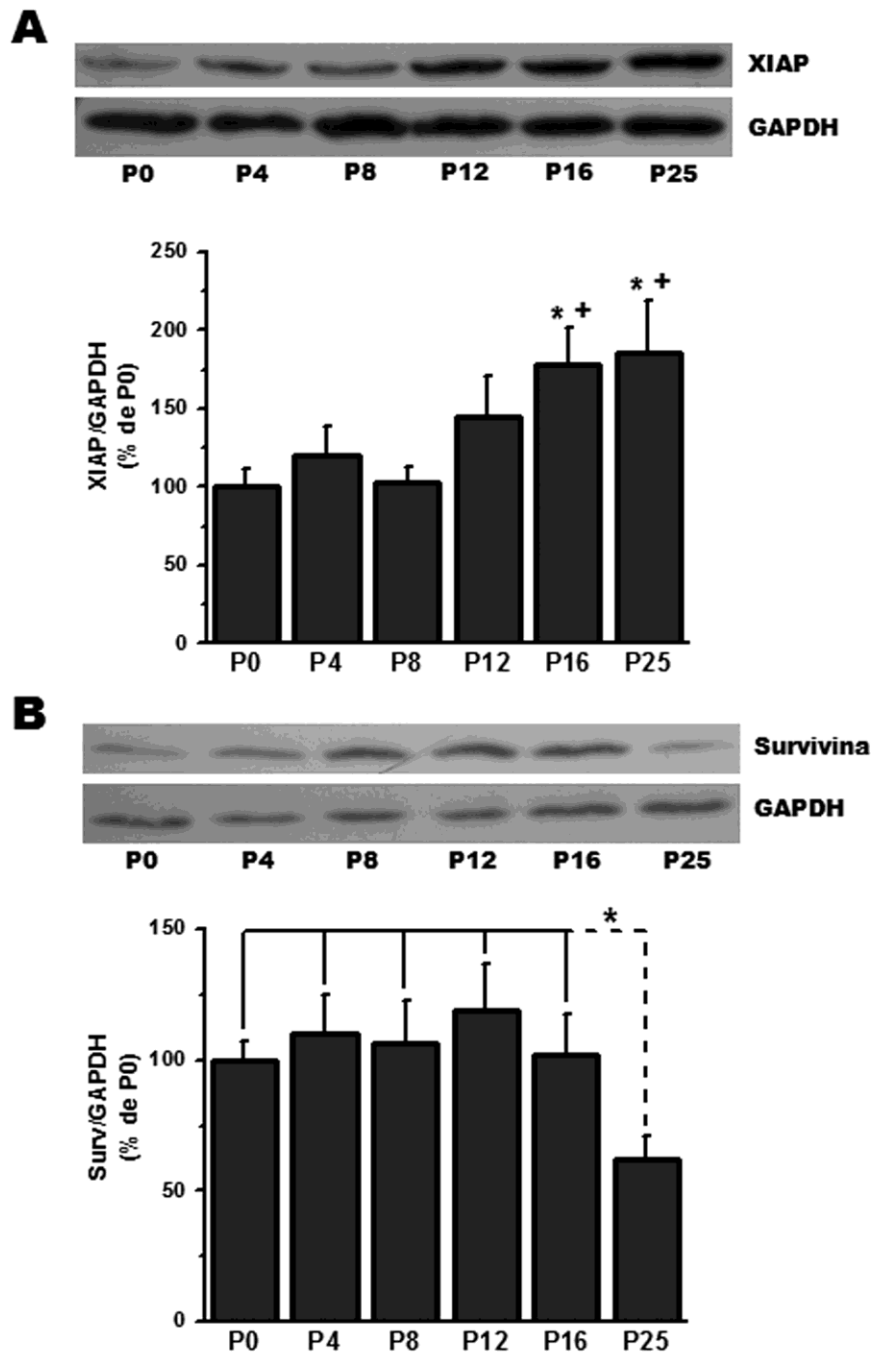
### **6.2.2 Localización de IAPs en la corteza cerebelar durante el desarrollo postnatal**

Mediante ensayos de inmunohistoquímica se determinó la localización de los niveles endógenos de las IAPs presentes en la corteza de cerebelos de rata obtenidos a diferentes edades de desarrollo postnatal: 0, 4, 8, 12, 16 y 25.

Ya que la XIAP y la survivina son de las IAPs que sufren cambios en sus niveles de proteína, en homogenados totales de cerebelo durante el desarrollo, se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica para estas proteínas. De este modo, con dichos ensayos se confirma que ambas IAPs se expresan en el cerebelo durante el desarrollo postnatal y que hay niveles de expresión diferenciales entre estas proteínas (Fig. 13 y 14). Más aún, no solo hay diferencias en los patrones de las cantidades relativas de estas IAPs (entre las diferentes etapas de desarrollo), sino que también hay diferencias en la localización de las proteínas dentro de la corteza cerebelar (Fig. 13 y 14).



**Figura 11. Niveles de las cIAPs durante el desarrollo del cerebelo.** Los niveles de las cIAPs se midieron por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. A) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de cIAP-1. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón cIAP1/GAPDH, considerando a P0 como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de ocho experimentos independiente. B) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de cIAP-2. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón cIAP2/GAPDH, considerando a P0 como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de cinco experimentos independiente. El asterisco indica significancia estadística *versus* P0 ( $p < 0.05$ ); + indica significancia estadística *versus* P4 ( $p < 0.05$ ); # indica significancia estadística *versus* P8 ( $p < 0.05$ ).

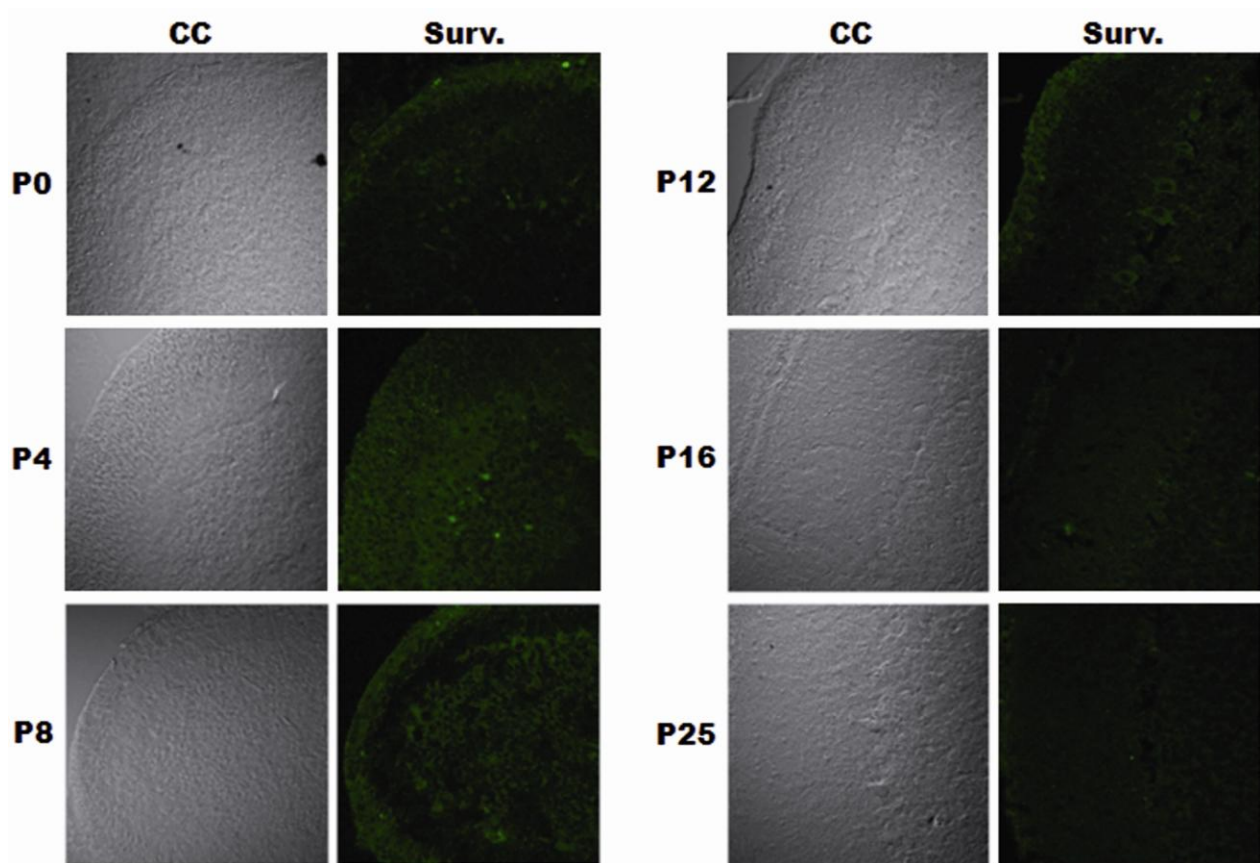


**Figura 12. Niveles de XIAP y de survivina durante el desarrollo del cerebelo.** Los niveles de las IAPs se midieron por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. A) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de XIAP. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón XIAP/GAPDH, considerando a P0 como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de ocho experimentos independiente. El asterisco indica significancia estadística *versus* P0 ( $p < 0.05$ ); + indica significancia estadística *versus* P8 ( $p < 0.05$ ). B) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de survivina. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón Surv/GAPDH, considerando a P0 como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de seis experimentos independiente. El asterisco indica significancia estadística *versus* P0-16 ( $p < 0.05$ ).

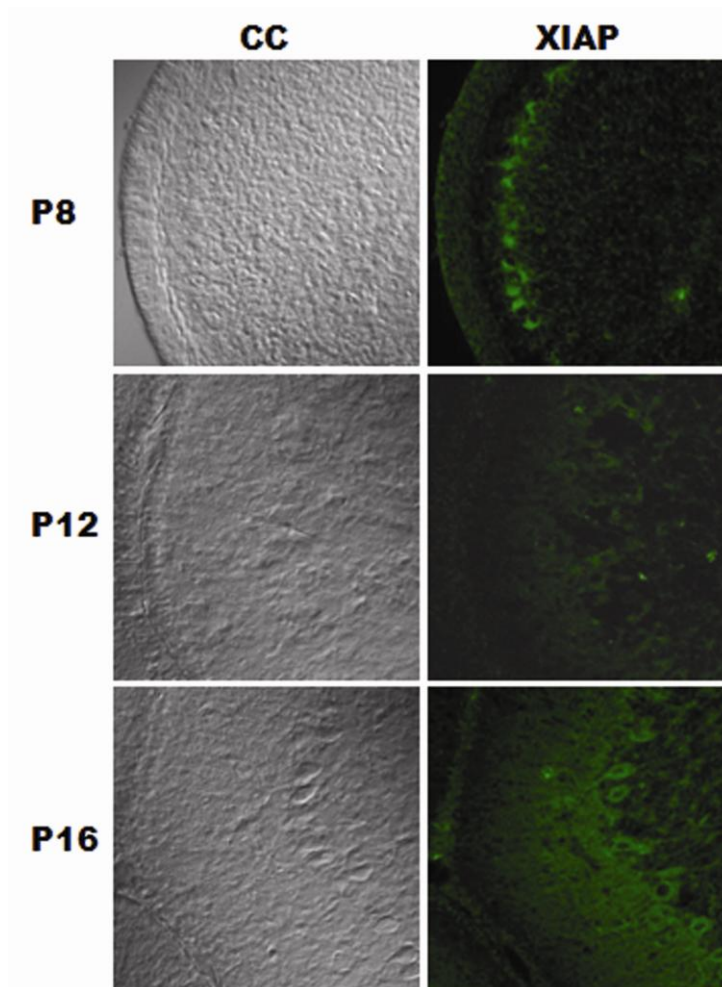


Por su parte, la survivina se encuentra distribuida de manera generalizada en la corteza cerebelar entre P0-4 (Fig. 13). Es decir, se observa presencia de esta IAP en la CGE, la insipiente CM y la CGI. A P8-12 la survivina se encuentra en la CGE, CP y CGI pero no en la CM (Fig. 13). Hacia P16 se observa una disminución generalizada de la proteína en la corteza cerebelar y ya para P25 disminución es dramática (Fig. 13) y consistente con lo observado en los homogenados totales de cerebelo (Fig. 12 B).

La XIAP se analizó en tres edades de desarrollo cerebelar: P8, P12 y P16. En los datos obtenidos de los niveles de esta proteína en homogenados de cerebelo, justo entre estas edades se encuentra el marcado incremento de los niveles de la proteína, a partir de P16 (Fig. 12 A). La XIAP se encuentra localizada, a relativamente bajos niveles, en ambas capas de neuronas granulares: CGE y CGI; pero los niveles más altos de esta proteína se encuentran en la CP (Fig. 14). A P12 se pierde la marcada diferencia de los niveles de la XIAP entre las capas de neuronas granulares y las neuronas de Purkinje (Fig. 14). Mientras que a P16 la localización de la XIAP es más generalizada en todas las capas de la corteza cerebelar: CGE, CM, CP y CGI. Además de ser visiblemente más abundante que a P8-12 (Fig. 14), corroborando los datos de los inmunoblots (Fig. 12 A).



**Figura 13. Localización cerebelar de survivina durante el desarrollo.** La distribución de survivina en cortes sagitales de cerebelo de diferentes edades postnatales (0, 4, 8, 12, 16 y 25; P0-25, respectivamente) se analizó por ensayos de inmunohistoquímica como se detalla en Procedimiento Experimental. Se muestran imágenes de microscopía confocal del cerebelo en desarrollo. Las diferentes capas de la corteza cerebelar se observan de izquierda a derecha: CGE, CM, CP y CGI. CC: campo claro; Surv.: survivina.



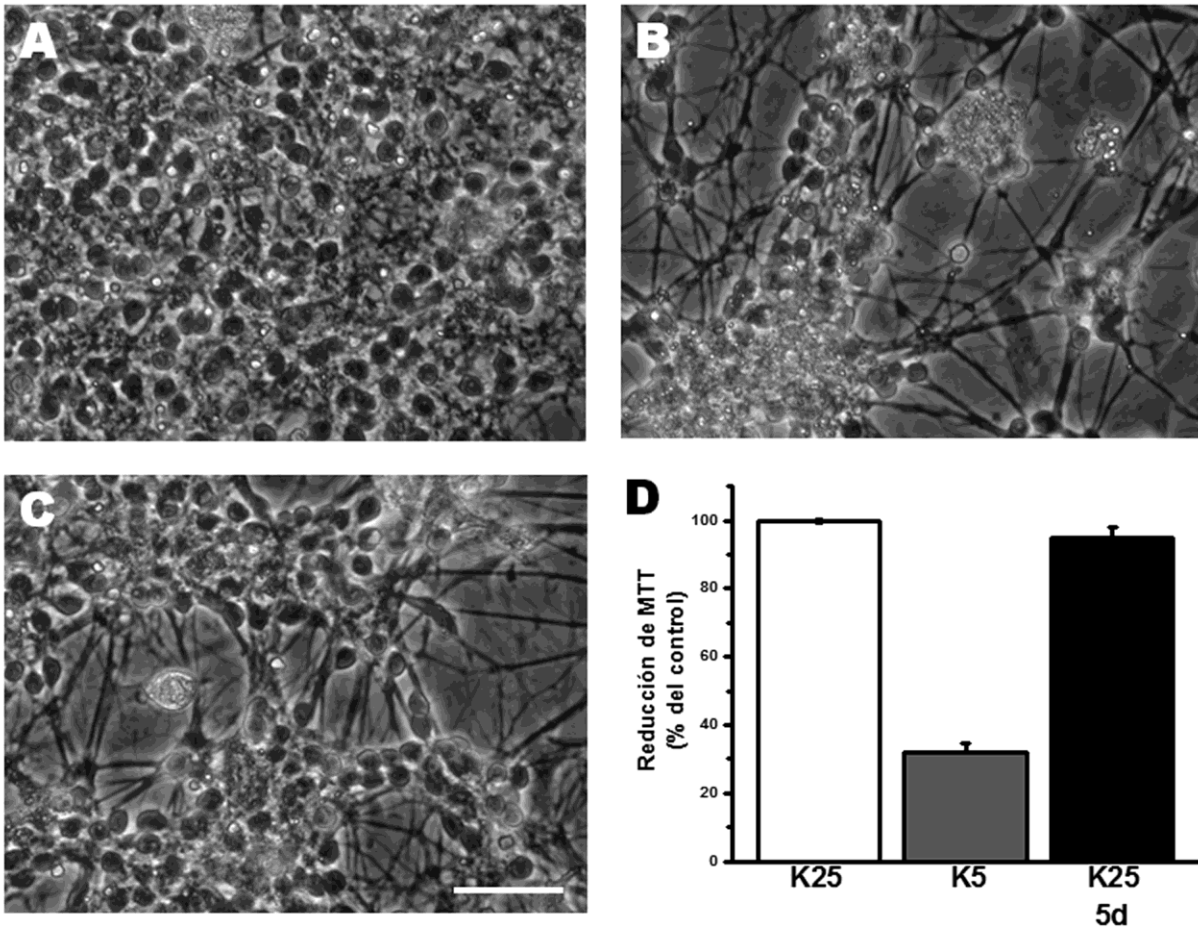
**Figura 14. Localización cerebelar de XIAP durante el desarrollo.** La distribución de XIAP en cortes sagitales de cerebelo de diferentes edades postnatales (0, 4, 8, 12, 16 y 25; P0-25, respectivamente) se analizó por ensayos de inmunohistoquímica como se detalla en Procedimiento Experimental. Se muestran imágenes de microscopía confocal del cerebelo en desarrollo. Las diferentes capas de la corteza cerebelar se observan de izquierda a derecha: CGE, CM, CP y CGI. CC: campo claro.

### **6.2.3 Efecto de K5 y K25 crónico en la viabilidad de NGC en cultivo**

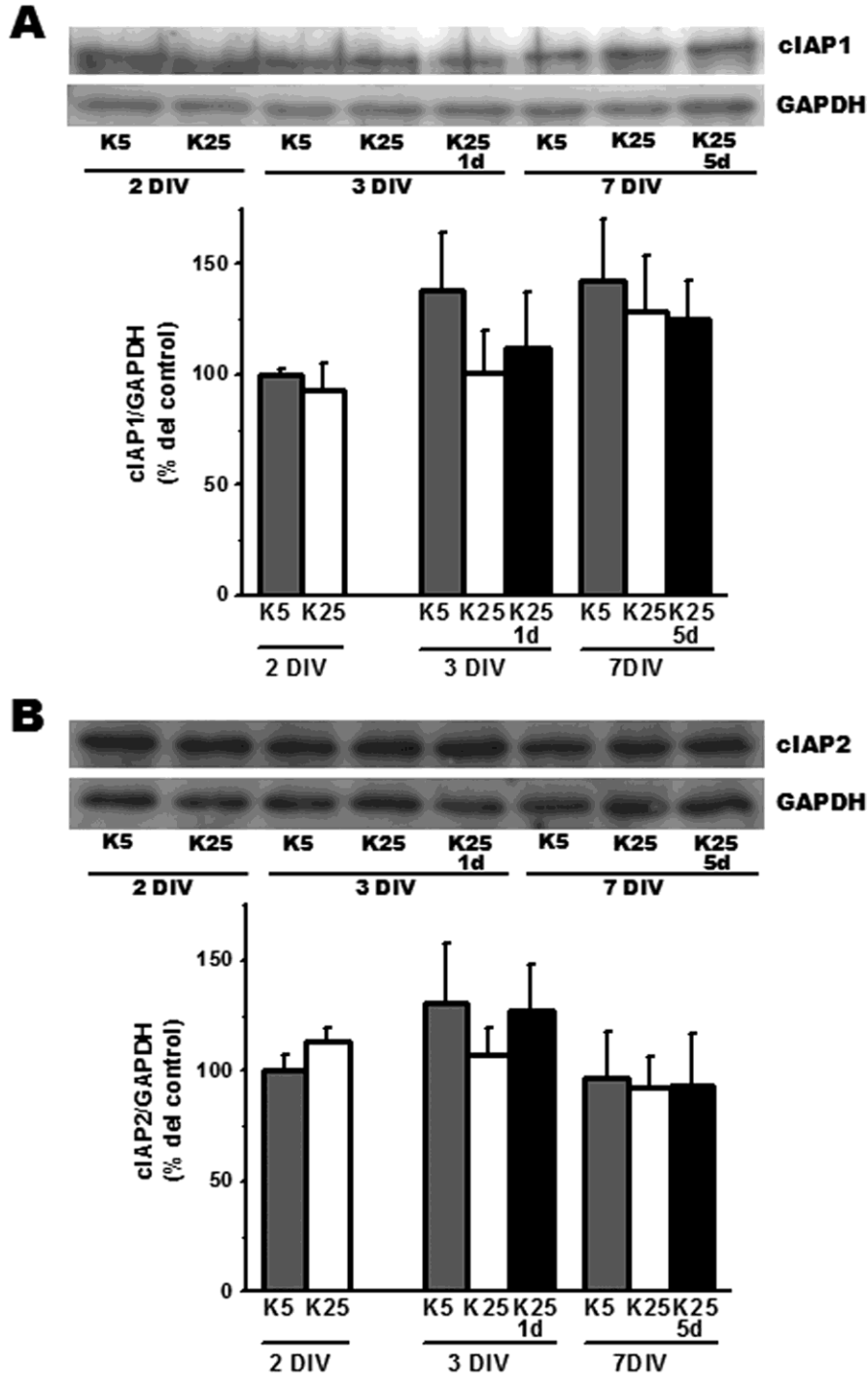
La viabilidad de las NGC cultivadas crónicamente en condiciones despolarizantes (K25), no despolarizantes (K5) y neuronas cultivadas en K5 y tratadas a los 2 DIV con K25, se midió por la reducción de MTT. Como está descrito por nuestro grupo y la literatura, con el ensayo de MTT se confirmó que a los 7 DIV la condición K25 promueve la sobrevivencia de las NGC mientras que K5 muestra una viabilidad del 30% con respecto a K25 (Fig. 15). Por su parte, las células cultivadas en K5 se recatan cuando se le agrega el potasio suficiente para alcanzar la condición despolarizante de K25 (K25 5d; Fig. 15).

### **6.2.4 Niveles de IAPs en NGC en condiciones de sobrevivencia inducida por despolarización con potasio**

Utilizando ensayos tipo Western blot se determinaron los niveles basales de las IAPs en NGC cultivadas, por diferentes días, en condiciones despolarizantes (K25) y no despolarizantes (K5) de potasio. Asimismo se midieron los niveles de las IAPs en NGC cultivadas en K5 por 2 DIV y rescatadas de la muerte con K25 (Fig. 15). En el caso de las cIAPs, se observa expresión endógena de ambas proteínas (cIAP-1 y cIAP-2) en todas las condiciones analizadas, sin encontrar efecto de las condiciones K5 o K25 sobre sus niveles (Fig. 16 A y B).



**Figura 15. Viabilidad de NGC cultivadas crónicamente en bajo potasio por 7 DIV.** NGC inmaduras, obtenidas de ratas de 8 días postnatales cultivadas por 7 días *in vitro* (DIV) en un medio con 25 mM KCl (K25) sobreviven (A). Pero si dichas células se cultivan por 7 DIV en un medio con 5 mM KCl (K5), las células mueren (B). La NGC cultivadas en K5 se pueden rescatar tratándolas con K25 a partir de los 2 DIV (C). El ensayo de reducción de MTT (D) muestra la viabilidad de las NGC bajo las condiciones indicadas en A, B y C (K25 5d). La barra indica 30  $\mu$ m de largo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de cuatro experimentos independiente.

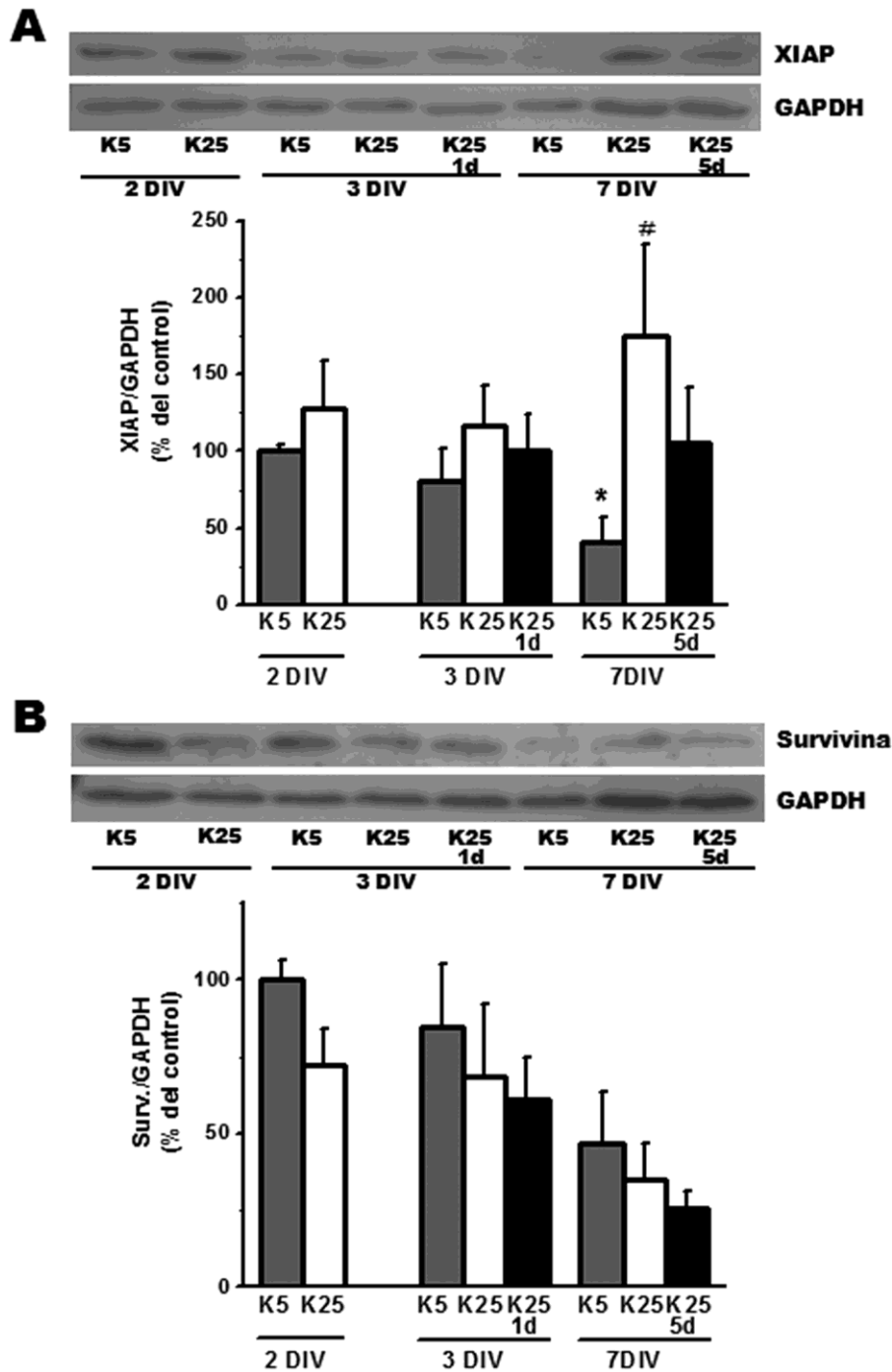


**Figura 16. Efecto de K5 y K25 en los niveles de las cIAPs.** Los niveles de las cIAPs se midieron por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. A) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de cIAP-1. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón cIAP1/GAPDH, considerando a K5 de 2 DIV como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de cinco experimentos independiente. B) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de cIAP-2. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón cIAP2/GAPDH, considerando a K5 de 2 DIV como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de seis experimentos independiente.

Particularmente, la XIAP se expresa en todas las condiciones examinadas. Siendo las NGC cultivadas en K25 la que presentan siempre (a 2, 3 y 7 DIV) niveles ligeramente mayores que en K5, mientras que en K5 se detecta una tendencia a disminuir con la edad del cultivo (Fig. 17 A). De este modo, las NGC mantenidas crónicamente en K5 hasta los 7 DIV presentan una disminución, estadísticamente significativa, en los niveles de XIAP comparado con las células de un cultivo joven de solo 2 DIV (Fig. 17 A). Por su parte la condición de K25 crónico, presenta hacia los 7 DIV, niveles de XIAP similares a los observados en K25 de 2 DIV y con una clara tendencia a ser mayores a los presentes en K5 de este tiempo; pero significativamente mayores a los presentes en K5 de 7 DIV (Fig. 17 A). En las NGC cultivadas solo por 2 días en K5 y rescatadas de la muerte celular por el tratamiento de K25 (K25 5d; Fig. 15), los niveles de XIAP se restauran comparados con los niveles presentes en las células en K5 de 7DIV (Fig. 17 A).

En el caso de la survivina, se observa la expresión basal de esta IAP en todas las condiciones examinadas (Fig. 17 B). Los niveles de esta IAP disminuyen con la edad del cultivo y de manera independiente al tratamiento, encontrándose los niveles más altos para cada condición a los 2 DIV y los más bajos a los 7 DIV (Fig. 17 B).

Estos resultados sugieren que la condición trófica de K25 promueve que los niveles de XIAP en los cultivos viejos (7 DIV) se mantengan similares a los que expresan las NGC en cultivos jóvenes (2 DIV) ya que sin dicha condición trófica los niveles de la IAP disminuyen con la edad del cultivo. Pero la cIAP-1, la cIAP-2 y la survivina parecen no ser importantes en la sobrevivencia inducida por K25.



**Figura 17. Efecto de K5 y K25 en los niveles de XIAP y de survivina.** Los niveles de las IAPs se midieron por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. A) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de XIAP. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón XIAP/GAPDH, considerando a K5 de 2 DIV como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de seis experimentos independiente. B) Arriba: Inmunoblot representativo de los niveles de survivina. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. Abajo: Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los resultados se expresan como el porcentaje de la razón Surv./GAPDH, considerando a K5 de 2 DIV como 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de cuatro experimentos independiente. El asterisco indica significancia estadística *versus* K5 de 2 DIV ( $p < 0.05$ ); # indica significancia estadística *versus* K5 de 7 DIV ( $p < 0.05$ ).

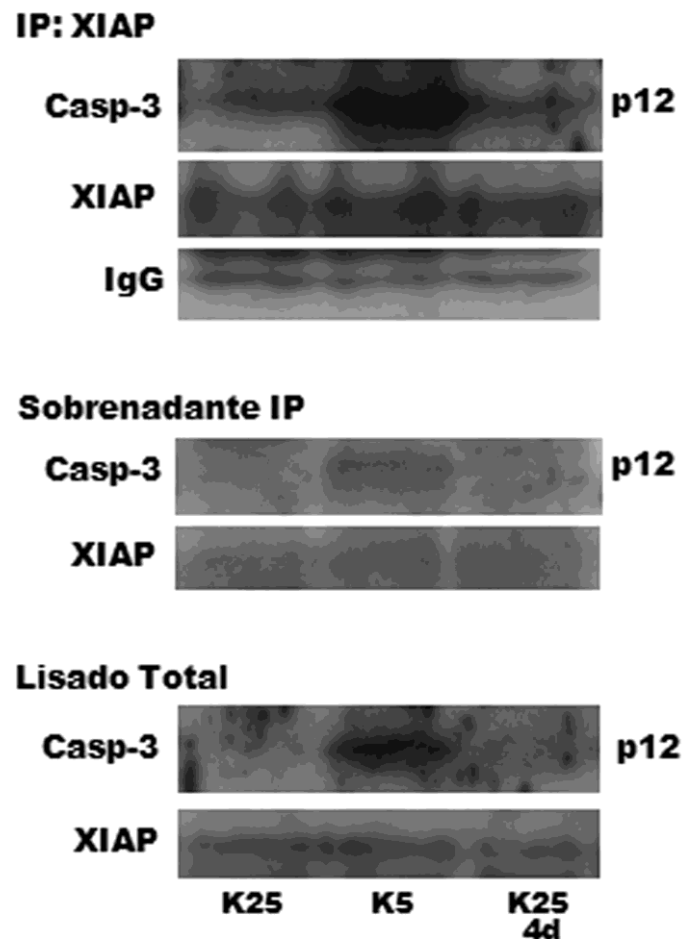


### **6.2.5 Efecto de K5 y K25 en la interacción XIAP/caspasa-3 activa**

Ya que la XIAP muestra diferencias de expresión entre K5 y K25 y los altos niveles de esta proteína podrían asociarse a la sobrevivencia de las NGC en cultivo, se analizó la posibilidad de que en las NGC cultivadas en K25, esta IAP interactúe con la caspasa-3 inhibiendo su actividad y promoviendo así la sobrevivencia celular. Para esto, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación seguidos por Western blot de NGC cultivadas por 6 DIV en K5, K25 o en K5 por 2 DIV y transferidas a K25 (K25 4d).

La XIAP inmunoprecipita con las subunidades que forman parte de la caspasa-3 activa en todas las condiciones analizadas (Fig. 18). Así, tanto en las condiciones que promueven la sobrevivencia de las NGC (K25 y K25 4d) como en la que se mueren (K5) se observa que hay caspasa-3 activa (subunidad p12) unida a la XIAP (Fig. 18).

Sin embargo, en la condición de K5, los bajos niveles de la XIAP (Fig. 17 A) son insuficientes para abolir la cantidad de caspasa-3 activa (Fig. 18). De este modo, los bajos niveles del tetrámero de caspasa-3 activa que se encuentran en las NGC en condiciones de sobrevivencias, K25 y K25 5d, son completamente secuestrados por XIAP (Fig.18). Esto es confirmado por los ensayos de actividad y de inmunofluorescencia de esta caspasa (*Fig. 5 de artículo anexo* en 6.1.1). Mientras que, los altos niveles de la caspasa-3 activa presente en K5 solo se encuentran parcialmente abatidos por los bajos niveles de XIAP de esta condición.



**Figura 18. Efecto de K5 y K25 en la interacción de XIAP y caspasa-3 activa.** Los niveles de la subunidad pequeña (p12) de la caspasa-3 activa unidos a XIAP se midieron por medio de la inmunoprecipitación de XIAP seguida por Western blot como se detalla en Procedimiento Experimental. Arriba (IP: XIAP): Inmunoblots representativos de los niveles de la subunidad pequeña (p12) de caspasa-3, XIAP e IgG presentes en los complejos inmunoprecipitados con XIAP de NGC cultivadas por 6 DIV en K25, K5 y K25 4d. En medio (Sobrenadante IP): Inmunoblots representativos de los niveles de la subunidad pequeña (p12) de caspasa-3 y XIAP presentes en el sobrenadante de las muestras, después de retirar los complejos inmunoprecipitados con XIAP de NGC cultivadas por 6 DIV en K25, K5 y K25 4d. Abajo (Lisado Total): Inmunoblots representativos de los niveles de la subunidad pequeña (p12) de caspasa-3 y XIAP presentes en los homogenados totales de NGC cultivadas por 6 DIV en K25, K5 y K25 4d antes de pasar por el proceso de inmunoprecipitación.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo abordan dos vertientes de los mecanismos reguladores de muerte/sobrevivencia de NGC, por un lado el papel proapoptótico de AIF y por el otro el papel pro-sobrevivencia de miembros de la familia de las IAPs.

Está bien descrito que las NGC cultivadas crónicamente en concentraciones bajas de potasio, mueren con características apoptóticas (Alavez et al., 2003; Xifro et al., 2005) incluyendo condensación nuclear y activación de caspasas. Pero bajo estas condiciones no se había elucidado el papel de AIF en la muerte celular de las NGC.

Por otro lado, también se sabe que las NGC cultivadas en concentraciones despolarizantes de potasio sobreviven y que bajo estas condiciones expresan algunos miembros de las IAPs, como la cIAP1, cIAP2, XIAP y survivina (Maycotte et al, 2008). Además, se ha reportado la inmunoprecipitación de caspasa-3 con XIAP en NGC cultivadas en presencia de NMDA (Xifro et al, 2006). Lo que sugiere fuertemente que la XIAP puede estar inhibiendo la activación de caspasas, particularmente de la caspasa-3, para mantener la sobrevivencia de las NGC promovida por la estimulación de los receptores NMDA.

De este modo, los resultados de este trabajo muestran que AIF y algunos miembros de la familia de las IAPs regulan los mecanismos de sobrevivencia o muerte celular de las NGC.

## **7.1 PAPEL DE AIF EN LA MUERTE APOPTÓTICA DE NEURONAS CEREBELARES**

En este trabajo corroboramos que las NGC cultivadas crónicamente en K5 mueren hacia los 5 DIV, pero no encontramos una correlación positiva entre la muerte de las NGC y los niveles totales de AIF, los cuales disminuyen marcadamente a los 7 DIV. Estos resultados pueden sugerir que AIF está más asociado a sobrevivencia que a la muerte celular de estas neuronas. En este contexto y como ya se mencionó, se ha propuesto que AIF tiene una función dual: aparte de su papel en los mecanismos de muerte celular, AIF puede ser importante en el mantenimiento de la fosforilación oxidativa y por lo tanto en la sobrevivencia celular (Vahsen et al., 2004; Hangen et al., 2010b). Además, en los ratones Arlequín, los cuales presentan una reducción del 80% en la expresión de AIF (Klein et al., 2002), el cerebelo muestra una pérdida progresiva de neuronas, incluyendo NGC. Más aún, en ratones con percursores de NGC y de Purkinje nulos de AIF, mutantes condicionales embriónicos, los percursores neuronales muestran proliferación y sobrevivencia reducida (Ishimura, et al., 2008).

Con base en esta información, es posible que AIF pueda ser un factor de sobrevivencia, durante los primeros días en cultivo, en NGC mantenidas crónicamente en K5; cuando los niveles de AIF son relativamente altos y antes de que comience el proceso de muerte celular. Sin embargo, se requieren más datos para demostrar lo anterior. Es interesante notar que a pesar de los niveles altos de AIF detectados, no se observa translocación nuclear durante los primeros 4 DIV. Después de este tiempo, los niveles de AIF se reducen y se presenta su translocación nuclear, evento que se ha demostrado ser necesario para su función proapoptótica (Joza et al., 2009; Hangen et al., 2010a). Por lo tanto, AIF puede tener una acción proapoptótica a este tiempo.

En este trabajo confirmamos las características apoptóticas de la muerte de las NGC inducida por el K5 crónico, incluyendo condensación nuclear, actividad de caspasa-3 y translocación de fosfatidíserina. Hay una correlación temporal entre la condensación nuclear y la actividad de caspasa-3 a 4 DIV. También encontramos liberación mitocondrial y translocación nuclear de AIF después de los 5 DIV. El número de células con translocación nuclear de AIF es más bajo que el de las células con caspasa-3 activa. Adicionalmente, observamos que inhibidores de catepsinas, pero no de calpaínas, reducen significativamente la liberación mitocondrial de AIF. Esto sugiere que en este modelo, la liberación mitocondrial de AIF depende de catepsinas pero no de calpaínas, las que se ha descrito ser importantes para la liberación mitocondrial de AIF inducido por otras condiciones (Joza et al., 2009; Hangen et al., 2010a).

Ya que a los 4 DIV no ocurre translocación de AIF, podemos concluir que AIF no es responsable de la morfología nuclear observada a este tiempo. Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones, la muerte apoptótica está principalmente mediada por un proceso dependiente de caspasas y que también hay un proceso de muerte apoptótico mediado por AIF. Es posible que haya una subpoblación de células muriendo por un mecanismo dependiente de caspasas y otra mediada por AIF. Alternativamente, también es posible que ambos mecanismos puedan estar ocurriendo en la misma célula. En este sentido, actualmente está bien aceptado que frecuentemente múltiples vías operan en paralelo durante la muerte neuronal (Kroemer et al., 2009; Nagley et al., 2010), particularmente en el caso de muerte dependiente de caspasas y muerte celular mediada por AIF (Joza et al., 2009).

La posibilidad de que AIF esté involucrada en la muerte apoptótica como un mecanismo de muerte alternativo está soportada por la evidencia de que la inhibición de

caspasas no reduce completamente la muerte de NGC o los parámetros apoptóticos, incluyendo la translocación de fosfatidilserina. La posibilidad de que la muerte celular pueda estar regulada por AIF bajo condiciones de inhibición de caspasas está sustentada por el marcado incremento de translocación de AIF al núcleo. Se ha reportado que AIF induce condensación de cromatina alrededor de la membrana nuclear que corresponde al estado I de condensación de cromatina de la morfología nuclear apoptótica (Yuste et al., 2005). Además, durante la inhibición de caspasas hay una reducción inicial de muerte celular que desaparece y hacia los 7 DIV la proporción de NGC muertas es la misma en presencia o ausencia de la inhibición de caspasas.

Asimismo, observamos un incremento en los niveles de AIF durante el desarrollo del cerebelo, particularmente a P12, probablemente debido al incremento del número celular en la CGE. Cuando analizamos la localización celular de AIF en estos animales encontramos un número significativo de neuronas con localización nuclear de AIF, de manera dependiente de la edad. El incremento observado en la cantidad de células positivas a AIF nuclear en la CGI a P12 puede estar relacionado al proceso masivo de muerte de NGC que ocurre durante la migración (de la CGE a la CGI) y sinaptogénesis de las NGC (Koppel et al., 1983). Por otro lado, el decremento observado de la cantidad de estas células positivas a AIF nuclear en la CM y CP, a P16-25 y P25 respectivamente, puede estar asociado a la disminución del proceso masivo de muerte en estas capas, el cual ocurre durante la segunda semana postnatal (White and Barone, 2001; Alavez et al., 2006b). Finalmente, el incremento de neuronas con núcleos positivos a AIF (y por lo tanto en proceso de muerte celular) en la CGE a P25 puede estar relacionado a la desaparición de esta capa a esta edad.

## **7.2 PAPEL DE LAS IAPs EN LA SOBREVIVENCIA DE NGC Y CÉLULAS CEREBELARES**

En este trabajo confirmamos los datos ampliamente reportados de que las NGC cultivadas en concentraciones despolarizantes de potasio (K25) sobreviven (Gallo et al., 1987; Balázs et al., 1988; Morán and Patel, 1989a, 1989b; Xifro et al., 2005). El efecto de la sobrevivencia inducida por K25 no solo lo observamos en la condición ya reportada de sembrar y mantener crónicamente a las NGC en K25. Igualmente, cuando las NGC se siembran de inicio en un medio no despolarizante (K5) y después de 2 DIV se transfieren a un medio K25, también observamos hacia los 7 DIV la recuperación de la sobrevivencia celular. Esto sugiere que durante los dos primeros días de cultivo no se ha iniciado el programa de muerte inducido por K5 o si se ha iniciado, se encuentra en un punto de retorno. Es decir, que en esta ventana de tiempo el soporte trófico aportado por la despolarización crónica no es tan determinante en la sobrevivencia celular a largo plazo (7 DIV) o bien, el balance de las señales intracelulares que determinaran la sobrevivencia/muerte de las NGC aún no se han definido por uno u otro proceso.

Como se menciona arriba, los ensayos de viabilidad muestran que las NGC cultivadas en K5 comienzan a mostrar una reducción de este parámetro a partir de los 5 DIV. No obstante, otros parámetros bioquímicos, como la condensación nuclear y actividad de la caspasa-3 se observan incrementados por efecto del K5 a los 4 DIV. De este modo, se acota la ventana de tiempo crítica a la falta del soporte trófico por la despolarización crónica entre 2-4 DIV. Desafortunadamente, en este trabajo no exploramos con más detalle el momento crítico en el que el programa de muerte inducido por K5 es irreversible y por lo tanto ya no se rescatan las células si se les transfiere a K25.

Por su parte, también corroboramos que bajo condiciones despolarizante de potasio, las NGC presentan niveles detectables de cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina (Maycotte et al, 2008). Sin embargo, no se había explorado el posible efecto, en la expresión de dichas proteínas, del mantenimiento crónico de las NGC en condiciones no despolarizantes de potasio. Así mismo, si la posible diferencia en los niveles de las IAPs, entre NGC mantenidas en K5 o K25, se pudiera asociar a la sobrevivencia de estas células.

En este sentido, encontramos que de los cuatro miembros de la familia de las IAPs explorados en este trabajo, todos presentan niveles de proteína detectables tanto en K25 como en K5. Sin embargo, se observa una regulación diferencial de sus niveles por efecto de K5, comparado con K25. Así, el K5 crónico puede no inducir cambios: cIAPs y survivina; o puede inducir una regulación a la baja: XIAP. Mientras que en las NGC sembradas en K5 y transferidas a K25, se mantienen los mismos niveles de las proteínas analizadas que los presentes en K25, tanto a los 3 DIV como a los 7 DIV. Esto último coincide con los resultados de viabilidad, en los que la adición de potasio a los 2 DIV restaura la sobrevivencia celular hacia los 7 DIV.

Examinando el comportamiento de los niveles de las IAPs analizadas, encontramos que en el caso de la cIAP-1 y cIAP-2 no hay diferencias ni por la concentración de potasio (alta o baja) ni por la edad del cultivo. Mientras que en el caso de la survivina, no hay efecto por la concentración de potasio pero si por la edad del cultivo. Esto sugiere, que los requerimientos celulares de esta survivina son importantes en las células de los cultivos jóvenes pero con el tiempo la demanda es menor. Más aún, si los requerimientos de survivina son en los cultivos jóvenes y el K5 no tiene efecto en la viabilidad a largo plazo en esta ventana de tiempo, es consistente que los niveles de survivina no se afecten con



el tratamiento de K5. Así que, tanto las cIAPs como la survivina, no parece estar asociadas a la sobrevivencia de las NGC promovida por K25, ya que sus niveles son los mismos que los encontrados en K5, aún cuando estas células están en proceso de muerte celular. Sin embargo, ya que el K5 induce la reducción dramática de los niveles de XIAP hacia los 7 DIV mientras que el K25 los mantiene constantes, parece haber una asociación entre los niveles de la IAP y la sobrevivencia de las NGC. Esto sugiere que de todos los miembros de las IAPs, particularmente la XIAP puede estar regulando la sobrevivencia de las NGC, específicamente en estas condiciones de cultivo.

En este sentido, se ha reportado que el tratamiento con NMDA o K25 en NGC cultivadas en K5 por 2 DIV, induce rápidamente un incremento en los niveles de XIAP, el cual va acompañado de un incremento del zimogeno de caspasa-3 interactuando con la IAP; esto hacia las 12 h de tratamiento (Xifro et al, 2006). Ya que dicho estudio se enfoca en los efectos tempranos de los tratamientos tróficos, en este trabajo se trató de determinar si la interacción XIAP/caspasa-3 se mantiene en el efecto de K25 sobre la sobrevivencia, a largo plazo (7 DIV), de las NGC. Pero ya que el análisis cristalográfico de la interacción de ambas proteínas ha reportado que la XIAP se une al tetrámero activo de la caspasa-3 (Riedl *et al*, 2001; Scott et al, 2005), en este trabajo se buscó la interacción de XIAP con las subunidades de la caspasa activa.

Los ensayos de inmunoprecipitación indican que ciertamente, la XIAP interactúa con la subunidad pequeña (de 12 kDa) del tetrámero activo de la caspasa-3. Dicha interacción ocurre en las NGC tanto en proceso de sobrevivencia (K25 y K25 4d) como en proceso de muerte (K5) y con mayor abundancia en las células que están muriendo, K5. Sin embargo, este resultado se explica si consideramos que en condiciones de sobrevivencia están presentes altos niveles de la IAP y es casi nula la cantidad de

caspara-3 activa; mientras que en K5, los niveles de XIAP están disminuidos y hay una gran cantidad de la caspara activa. De este modo, en K25 los altos niveles de XIAP son capaces de secuestrar todas las moléculas de caspara-3 activa. Por su parte, en K5 todas las moléculas presentes de XIAP secuestran a tetrámeros de caspara-3 pero siendo relativamente pocas moléculas de XIAP, queda una proporción de tetrámeros libres para continuar con el proceso de muerte. En este sentido, se observa que no hay caspara-3 activa libre después de inmunoprecipitar a XIAP en K25 ni en K25 4d, pero si hay en K5. Lo que sugiere que la cantidad disponible de XIAP en K5 no es capaz de abatir los niveles de caspara-3 activa, mientras que en K25 sí.

De igual forma, observamos expresión de cIAP-1, cIAP-2, XIAP y survivina, en el cerebelo durante el desarrollo, pero con niveles de expresión diferencial. En el cerebelo, al igual que en los cultivos primarios de NGC, la cIAP-1 no muestra cambios en sus niveles durante el desarrollo. Pero en el caso de la cIAP-2, si hay una disminución en los niveles de esta proteína durante el desarrollo del cerebelo, que no se observa en los cultivos de NGC. Lo cual sugiere que la disminución en los niveles de esta proteína probablemente no ocurre en las NGC sino en otros tipos celulares presentes en el cerebelo. En el caso de la survivina, la disminución observada en sus niveles hacia el final del desarrollo del cerebelo (P25) es consistente con los resultados *in vitro*, donde observamos la misma disminución con la edad del cultivo. Asimismo, la localización de survivina en la corteza cerebelar en desarrollo, muestra una amplia distribución durante la primera semana de desarrollo postnatal, con una dramática disminución generalizada hacia la cuarta semana de desarrollo. Esto sugiere que la survivina es importante durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo pero su función no parece estar asociada a la sobrevivencia celular en el estado terminal de desarrollo (P25).

Del mismo modo que en los resultados *in vitro*, los niveles de XIAP incrementan durante el desarrollo del cerebelo. En la segunda semana de desarrollo postnatal la XIAP se localiza en las capas de neuronas granulares (CGE y CGI) pero mayormente en las neuronas de Purkinje. Mientras que hacia la tercer semana, la localización de XIAP es más generalizada en toda la corteza cerebelar, además de ser visiblemente más abundante que en la segunda, corroborando los datos bioquímicos. Cabe destacar que los resultados *in vitro* reflejan el incremento de XIAP en las NGC durante su desarrollo *in vivo*. Lo anterior, apoya la idea de que esta IAP puede ser importante en el mantenimiento de la sobrevivencia celular en el cerebelo.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la muerte apoptótica de NGC, tanto *in vitro* como *in vivo*, parece estar regulada principalmente por caspasas, aunque una fracción de la muerte puede estar mediada por AIF. Por otro lado, sugerimos que el programa de muerte de las NGC mediado por caspasas puede cambiar por uno alternativo mediado por AIF bajo ciertas condiciones, como cuando se encuentran inhibidas las caspasas.

Por otro lado, la sobrevivencia de las NGC en condiciones *in vitro* e *in vivo*, podría estar regulado positivamente por IAPs, particularmente por la XIAP a través de su capacidad de inhibir a las caspasas y por lo tanto al programa de muerte celular.

## IX. REFERENCIAS

- Alavez, S., Blancas, S., Morán, J. (2006a). Effect of NMDA antagonists on the death of cerebellar granule neurons at different ages. *Neurosci. Lett.* 398, 241–245.
- Alavez, S., Blancas, S., Morán, J. (2006b). Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on caspase activation and neuronal death in the developing rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 404, 176–181.
- Alavez, S., Gutiérrez-Kobeh, L., Morán, J. (1996). Characterization of the activation of glutaminase induced by N-Methyl-D-Aspartate and potassium in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research.* 45: 637-646.
- Alavez, S., Pedroza, D., Morán, J. (2003). Mechanisms of cell death by deprivation of depolarizing conditions during cerebellar granule neurons maturation. *Neurochem. Int.* 43, 581–590.
- Altman, J. (1972). Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat: III. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neur.* 145: 465-514.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. (1997). A novel antiapoptosis gene, *survivin*, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3: 917–921.
- Arsenio-Nuñez, M. L., Sotelo, C. (1985). Development in the spino cerebral system in the postnatal rat. *Journal Comparative Neurology.* 237: 291-306.
- Balázs, R., Gallo, V., Kingsbury, A. (1998). Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Developmental Brain Research.* 40: 269-279.
- Balázs, R., Hack, N., Resink, A., Aronica, E., Van der Valk, J.B.F. (1992). Trophic effect of excitatory amino acids on differentiating granule cells: involvement of calcium and other second messengers. *Molecular Neuropharmacology.* 2: 203-206.
- Balázs, R., Jorgensen, O.S., Hack, N. (1988). N-Methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* 27, 437–451.
- Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2004). Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol. Cell.* 14: 801-811.
- Birkey Reffey, S., Wurthner, J.U., Parks, W.T., Roberts, A.B., Duckett, C.S. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 26542–26549.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., *et al.* (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell.* 11: 529–541.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell Developmental Biology.* 15: 269-90.
- Burgoyne, R., Cambray-Deakin, M. (1988). The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Research Reviews.* 13: 77-101.

- Burgoyne, R., Graham, M.E., Cambray-Deakin, M. (1993). Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *Journal of Neurocytology*. 22: 689-695.
- Buss, R.R., Sun, W., Oppenheim, R.W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci*. 29:1-35.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 406: 855–862.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E.S., Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell*. 104: 769–780.
- Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., Tsuruo, T. (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 264:847-854.
- Christie, L.A., Su, J.H., Tu, C.H., Dick, M.C., Zhou, J., Cotman, C.W. (2007). Differential regulation of inhibitors of apoptosis proteins in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Dis*. 26:165-173.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., Ballard, D.W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- $\kappa$ B control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 10057–10062.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 326: 1-16.
- D'Mello, S.R., Galli, C., Ciotti, T., Calissano, P. (1993). Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium : inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 10989-10993.
- Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., et al. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J. Biol. Chem*. 279: 5405–12.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gene & Development*. 13 (3): 239-52.
- Diwakarla, S., Nagley, P., Hughes, M.L., Chen, B., Beart, P. M. (2009). Differential insult-dependent recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway during neuronal programmed cell death. *Cell. Mol. Life Sci*. 66, 156-1572.
- Donepudi, M., MacSweeney, A., Briand, C., Grutter, M. G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell*. 11: 543–549.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell*. 102: 33–42.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J*. 15: 2685–2689.
- Eldadah, B. A., Ren, R. F., Faden, A. I. (2000). Ribozyme-mediated inhibition of caspase-3 protects cerebellar granule cells from apoptosis induced by serum-potassium deprivation. *The Journal of Neuroscience*. 20 (1): 179-186.

Fonfría, E., Daré, E., Benelli, M., Suñol, C., Ceccatelli, S., (2002). Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2013-2016.

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

Ghez, C., Thach, W. T. The cerebellum en Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (eds.). (2000). *Principles of Neural Science.* 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, Inc. USA. pp. 832-852.

Goldowitz, D. Hamre, K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends in Neuroscience.* 21 (9): 375-382.

Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. (1995). Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *NeuroReport.* 9 (10): R49-R55.

Gyrd-Hansen, M., Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 10 (8): 561-74.

Hangen, E., Blomgren, K., Bénit, P., Kroemer, G., Modjtahedi, N. (2010a). Life with or without AIF. *Trends Biochem Sci.* 35 (5): 278-87.

Hangen, E., De Zio, D., Bordi, M., Zhu, C., Dessen, P., Caffin, F., Lachkar, S., Perfettini, J.L., Lazar, V., Benard, J., Fimia, G.M., Piacentini, M., Harper, F., Pierron, G., Vicencio, J.M., Bénit, P., de Andrade, A., Höglinger, G., Culmsee, C., Rustin, P., Blomgren, K., Cecconi, F., Kroemer, G., Modjtahedi, N. (2010b). A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. *Cell Death Differ.* 17, 1155-1166.

Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., Naito, M. (2004). Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nature Cell Biology.* 6 (9): 849-60.

Hauser, H.P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J. Cell Biol.* 141: 1415–1422.

Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., *et al.* (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein–caspase interaction. *J Biol Chem.* 277: 432–8.

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

Hofer-Warbinek, R., Schmid, J. A., Stehlik, C., Binder, B. R., Lipp, J., de Martin, R., *et al.* (2000). Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J. Biol. Chem.* 275: 22064–8.

Hofmann, K., Bcher, P., Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends Biochemical Science.* 22: 155-156.

Holcik, M., Thompson, C. S., Yaraghi, Z., Lefebvre, C. A., MacKenzie, A. E., Korneluk, R. G. (2000). The hippocampal neurons of neuronal apoptosis inhibitory protein 1 (NAIP1)-deleted mice display increased vulnerability to kainic acid-induced injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (5): 2286-90.

Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*. 104: 781–790.

Ishimura, R., Martin, G.R., Ackerman, S.L., (2008). Loss of apoptosis-inducing factor results in cell-type-specific neurogenesis defects. *J. Neurosci*. 28, 4938-4948.

Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., Kroemer, G. (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann. NY Acad. Sci*. 1171: 2-11.

Kerr, J.F.R., Harmon, B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective en Tomei, L. D., Cope, F. O. (eds.). *Apoptosis: The molecular basis of cell death (Current Communications in cell and molecular biology. vol 3)*. Cold Spring Harbor Laboratori Press. USA. pp. 5-29.

Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419: 367-374.

Koppel, H., Lewis, P.D., Patel, A.J., (1983). Cell death in the early granular layer of normal and undernourished rats: further observations, including estimates of rate of cell loss. *Cell Tissue Kinet*. 16: 99–106.

Korhonen, L., Näpänkangas, U., Steen, H., Chen, Y., Martinez, R., Lindholm, Dan. (2004). Differential regulation of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and caspase-3 by NMDA in developing hippocampal neurons; involvement of the mitochondrial pathway in NMDA-mediated neuronal survival. *Experimental Cell Research*. 295: 290– 299.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16, 3-11.

Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*. 94 (3): 325-37.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 384: 368-372.

Lange, W. (1975). Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell and Tissue Research*. 157: 115-24.

Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., *et al.* (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with Survivin function. *Nat Cell Biol*. 1: 461–6.

Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., Korneluk, R. G. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*. 3: 128-33.

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

Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J. C., Fesik, S. W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408: 1004–1008.

Mace PD, Shirley S, Day CL. (2010). Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ.* 17 (1): 46-53.

MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S., Cohen, G. M. (2002). Proteasome mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem.* 277: 36611–6.

Maycotte, P., Blancas, S., Morán, J. (2008). Role of inhibitor of apoptosis proteins and Smac/DIABLO in staurosporine-induced cerebellar granule neurons death. *Neurochem Res.* 33 (8): 1534-40.

Millen, K.J., Gleeson, J.G. (2008). Cerebellar development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 18 (1): 12-9.

Morán, J., Alavez, S., Rivera-Gaxiola, M., Valencia, A., Hurtado, S., (1999). Effect of NMDA antagonists on the activity of glutaminase and aspartate aminotransferase in the developing rat cerebellum. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 17 (1): 57-65.

Morán, J., Dominguez, G., Alavez, S. (1996). NMDA receptor activation and apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos de México.* 44: 49-51.

Morán, J., Patel, A. J. (1989b). Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Research.* 486: 15-25.

Morán, J., 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.

Nachmias, B., Ashhab, Y., Ben-Yehuda, D. (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 14: 231–243.

Nagley, P., Higgins, G.C., Atkin, J.D., Beart, P.M. (2010). Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 167-85.

Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience.* 14: 453-501.

Perrelet, D., Ferri, A., Liston, P., Muzzing, P., Korneluka, R., Kato, A. (2002). IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons in vivo. *Nature Cell Biology.* 4: 175-79.

Perrelet, D., Perrin, F. Liston, P., Korneluk, R., MacKenzie, A. Ferrer-Alcon, M., Kato, A. (2004). Motoneuron resistance to apoptotic cell death in vivo correlates with the ratio between X-linked



inhibitor of apoptosis proteins (XIAPs) and its inhibitor, XIAP-associated factor 1. *The Journal of Neuroscience*. 24 (15): 3777-85.

Potts, P. R., Singh, S., Knezek, M., Thompson, C. B., Deshmukh, M. (2003). Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 163 (4): 789-799.

Renatus, M., Stennicke, H. R., Scott, F. L., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 14250–14255.

Richter, B. W., Mir, S., Eiben, L. J., Lewis, J., Reffey, S. B., Frattini, A., Tian, L., Frank, S., Youle, R. J., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., Vezzoni, P., Fearnhead, H. O., Duckett, C. (2001). Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol. Cell Biol*. 21, 4292–4301.

Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*. 104: 791–800.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M., Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243–1252.

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

Russell, J.C., Blue, M.E., Johnston, M.V., Naidu, S., Hossain, M.A. (2007). Enhanced cell death in MeCP2 null cerebellar granule neurons exposed to excitotoxicity and hypoxia. *Neuroscience*. 150, 563-574.

Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 10964–10967.

Salvesen, G. S., Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3 (6): 401-10.

Schilling, K., Oberdick, J., Rossi, F., Baader, S.L. (2008). Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol*. 130 (4): 601-15.

Schilling, K. (2000). Lineage, development and morphogenesis of cerebellar interneurons. *Progress in Brain Research*. 124: 51-68.

Scott, F. L. et al. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J*. 24, 645–655.

Seidl, R., Bajo, M., Bohm, K., LaCasse, E. MacKenzie, A., Cairns, N., Lubec, G. (1999). Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-like immunoreactivity in brains of adult patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*. 57: 283-91.

Sendtner, M., Pei, G., Beck, M., Scheizer, U., Wiese, S. (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res*. 301: 71-84.

- Shi, Y. (2002a). A conserved tetrapeptide motif: Potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ.* 9: 93–95.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science.* 13: 1979-1987.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* 11: 519–527.
- Sillitoe, R.V., Joyner, A.L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23: 549-77.
- Simons, M., Beinroth, S., Gleichmann, M., Liston, P., Korneluk, R. G., MacKenzie, A. E., Bähr, M., Klockgether, T., Robertson, G. S., Weller, M., Schulz, J. B. (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis proteins delays apoptosis in cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry.* 72 (1): 292-301.
- Slagsvold, H.H., Rosseland, C.M., Jacobs, C., Khuong, E., Kristoffersen, N., Gaarder, M., Fallgren, A.B., Huitfeldt, H.S., Paulsen, R.E., (2003). High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 984, 111-21.
- Song, Z., Yao, X., Wu, M. (2003). Direct interaction between Survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of Survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 278: 23130–40.
- Srinivasula, S. M., Saleh, A., Hedge, R., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature.* 410 (6824): 112–116.
- Stennicke, H.R., Ryan, C.A., Salvesen, G.S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci.* 27 (2): 94-101.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274: 8359–8362.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397(6718):441-6.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., Takahashi, R. (2001a). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* 8: 613–21.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 8662–7.

- Tanaka, M., Marunouchi, T. (1998). Immunohistochemical analysis of developmental stage of external granular layer neurons which undergo apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Neuroscience Letters*. 242: 85-88.
- Tanaka, M., Momoi, T., Marunouchi, T. (2000). *In situ* detection of activated caspase-3 in apoptotic granule neurons in the developing cerebellum in slice cultures and in vivo. *Developmental Brain Research*. 121: 223-228.
- Thornberry, N., Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*. 281: 1312-6.
- Troy, C. M., Rabacchi, S. A., Hohl, J. B., Angelastro, J. M., Greene, L. A., Shelanski, M. L. (2001). Death in the Balance: Alternative Participation of Caspase-2 and -9 Pathways in Neuronal Death Induced by Nerve Growth Factor Deprivation. *The Journal of Neuroscience*. 21 (14): 5007-16.
- Vahsen, N., Candé, C., Brière, J.J., Bénit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schägger, H., Rustin, P., Kroemer, G. (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*. 23, 4679-4689.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43–53.
- Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol*. 10: 1359-1366.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281 (5383): 1680-1683.
- White, L.D., Barone, S.Jr., 2001. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ*. 8, 345-356.
- Wingate, R. J. T. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Current Opinion in Neurobiology*. 11 (1): 82-88.
- Wood, K.A., Dipasquale, B., Youle, R.J. (1993). In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11, 612–632.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J-W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008–1012.
- Xifro, X., Falluel-Morel, A., Miñano, A., Aubert, N., Fadó, R., Malagelada, C., Vaudry, D., Vaudry, H., Gonzalez, B., Rodríguez-Alvarez, J. (2006). N-methyl-D-aspartate blocks activation of JNK and mitochondrial apoptotic pathway induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*. 281 (10): 6801-12.
- Xifro, X., Malagelada, C., Miñano, A., Rodríguez-Alvarez, J. (2005). Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *Eur. J. Neurosci*. 21, 827–840.

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., *et al.* (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* 18: 179–87.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science.* 288: 874–7.

Yuste, V.J., Sánchez-López, I., Solé, C., Moubarak, R.S., Bayascas, J.R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S.A., Comella, J.X. (2005). The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 35670-35683.